



# Cellules souches pluripotentes induites de lapin : caractérisation moléculaire et fonctionnelle des états naïf et amorcé

Yann Taponnier

## ► To cite this version:

Yann Taponnier. Cellules souches pluripotentes induites de lapin : caractérisation moléculaire et fonctionnelle des états naïf et amorcé. Biologie du développement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10029 . tel-01149017

**HAL Id: tel-01149017**

**<https://theses.hal.science/tel-01149017>**

Submitted on 6 May 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

**Délivrée par**

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**ECOLE DOCTORALE**

**BMIC**

**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**DIPLÔME DE DOCTORAT**

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 06 Mars 2015

par

**M. TAPPONNIER Yann**

TITRE :

**Cellules souches pluripotentes induites de lapin :**

**Caractérisation moléculaire et fonctionnelle  
des états naïfs et amorcés**

**Thèse dirigée par : Dr. SAVATIER Pierre**

**Composition du Jury :**

Prof. DERRINGTON Edmund (Président du jury)

Dr. BEAUJEAN Nathalie (Rapporteur)

Dr. BŒUF Hélène (Rapporteur)

Dr. COHEN-TANNOUDJI Michel (Examineur)

Dr. SAVATIER Pierre (Examineur)



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE



## Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas pu être mené à bien sans la participation, de près ou de loin, de nombreuses personnes que je souhaite remercier ici.

Mes remerciements iront tout d'abord aux membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail, Dr. Nathalie Beaujean, Dr. Hélène Bœuf et Dr. Michel Cohen-Tannoudji, avec une attention particulière pour mes rapporteurs. Je souhaite également remercier le président de mon jury, Prof. Edmund Derrington qui a été mon professeur à différentes reprises et qui m'a notamment fait découvrir le monde merveilleux des cellules souches.

Je souhaite remercier les directeurs de l'Institut Cellule Souche et Cerveau, Dr. Colette Dehay et Dr. Henri Kennedy pour m'avoir accueilli au sein de l'U846 et permis de réaliser mon doctorat.

Je voudrais également remercier les membres ayant participé à mes comités de suivi de thèse pour nos discussions fort profitables à l'avancée de mes travaux, Dr. Véronique Duranthon, Dr. Hervé Acloque et encore une fois le Prof. Edmund Derrington. Hervé, merci également pour ta visite guidée de Toulouse.

Je remercie chaleureusement Pierre Savatier pour m'avoir accepté dans l'équipe il y a plus de 6 ans. Je te remercie pour ta confiance, ta disponibilité et ta réactivité presque 24h sur 24h (ex : rapport biblio envoyé à 2h du matin, corrigé à 7h) ainsi que pour ton soutien sans faille durant toute ma thèse. Bien qu'ayant mis près de deux ans avant de te tutoyer, je suis venu rapidement "t'embêter". Depuis le premier jour, tu as toujours pris le temps de répondre à mes innombrables questions et je me rends compte aujourd'hui à quel point ce n'est pas chose courante. Merci aussi pour toutes les heures de correction de mes écrits, de ton aide et tes conseils aux moments de panique (thèse et/ou post-doc). Merci de m'avoir fait voyager autant et permis de découvrir tant de choses (plus de 2 mois cumulés pour pas loin de 10 destinations). Je tenais également à te remercier car, grâce à toi, j'ai eu le luxe de ne jamais avoir à me soucier des financements, ce qui m'a permis de mener à bien ce projet jusqu'au bout. Merci d'avoir accueilli dans ton équipe l'étudiant que j'étais et formé le scientifique que je suis aujourd'hui.

Un grand merci à ma co-encadrante Marielle Afanassieff qui fut là pour moi du premier au dernier jour, pour paraphraser Pierro : « ma maman du labo ». Reprenons depuis le début, c'est avec toi que j'ai commencé l'aventure dans l'équipe durant mon M1, lorsque tu m'as initié à "l'art" de la culture. C'est grâce à la confiance que tu as placée en moi que j'ai pu continuer en Master 2 et par conséquent en thèse. Je me rappellerai longtemps du repas dans ta famille le jour de la fête des mères pour corriger mon rapport de M2. Ça continue encore aujourd'hui en sacrifiant tes vacances pour que je puisse terminer à temps !!! (Merci pour ce joli cadeau fort bien décoré). Je ne parlerai pas de tes encouragements dans les moments difficiles ni de ta capacité à toujours relativiser et dédramatiser (même quand on fait des bêtises !). Je suis très heureux de te connaître et d'avoir pu travailler avec toi durant toutes ces années.

Je continuerai en remerciant Thierry Joly sans qui aucune expérience n'aurait été possible. Merci pour toutes les heures de chirurgie et désolé pour tes nombreux week-ends passés à inséminer des lapines. Merci pour ta bonne humeur constante et tes blagues nous ayant permis de terminer ces longues journées au 2<sup>ème</sup> étage.

Pierro... que dire... je te considère comme mon alter ego lapinou, j'ai adoré les 4/5 années passées à travailler à tes côtés (au sens propre comme au figuré). Je me souviendrai toujours de la session tri, de Virage et notre contest, ainsi que de nos mini réunions/pauses clopes, pour résumer : notre vie au P2. Je garderai également en mémoire les innombrables soirées partagées, à 2 puis à 4, les soirées jeux et bien sûr nos perpétuels débats sans fin qu'ils soient scientifiques ou non. Je me rappellerai longtemps d'autres bons moments en communs (souvent une bière à la main) à Villeurbanne, Lyon, Saint François, Beauvoir, Tour, Saint Raph, Paris, Cardiff, Budapest, Boston et bien sûr New York. En espérant boire prochainement une bière avec toi sur un autre continent. J'ai vraiment grandi scientifiquement et personnellement à tes côtés, il me faudrait écrire une autre thèse juste pour finir mes remerciements pour toi, donc je vais m'arrêter là.

Vincent, mon plus long colocataire au SBRI, d'humeur égale toute l'année. Il faut savoir qu'en plus d'être l'Indiana Jones de la science, Vincent est le MacGyver des blagues, réussissant à nous piéger avec un écran, un clavier, un tiroir ou même DES timers !!! Merci pour ta curiosité et toutes tes anecdotes scientifiques (ou non), dont tu nous faisais part quotidiennement. J'ai adoré toutes les soirées que tu as organisées, Halloween, jeux et autres (A cause de toi j'ai une bourse rempli de cristaux). Je me rappellerai longtemps également les semaines de comptes-rendus/café avec Pierro autour de GOT et W.D qui ont rendu ces séries

encore meilleures à mes yeux. Je vous souhaite à toi et ta moitié tout le bonheur possible et que tu réussisses à te faire une place dans la branche que tu as choisie. Bien sûr, je serai toujours heureux de lire tes articles !

Merci à Anaïs qui reste toujours la plus jeune de l'équipe malgré l'arrivée massive de stagiaires. Merci pour ta bonne humeur et ta motivation sans faille. J'ai adoré travailler avec toi pendant ton EPHE et je te remercie particulièrement pour ton aide dans cette dernière année. Ces 6 derniers mois furent compliqués pour nous deux, et mon état d'esprit faisait souvent écho avec le tien, du coup il était réconfortant de discuter avec toi. Finalement, c'était une belle aventure pleine de rebondissements qui finit en happy end, tu ne trouves pas ?

Merci à toi, Maxime, pour m'avoir apporté tes connaissances et compétences en embryologie. Merci d'avoir pris tant soin de ces millions de petits embryons. Tu m'as également beaucoup appris sur une culture et des pays pas si loin de la France, lors de nos nombreuses discussions en attendant les papiers d'alu... Enfin un grand merci à ton côté père-noël pour m'avoir apporté le plus beau cadeau de cette fin d'année !!!

Fabrice : merci pour ta gentillesse, car je pense que c'est le mot qui te définit le mieux (juste devant « Français » hihi). Merci pour ton aide apportée à maintes reprises au labo (tu as même été lapin un temps) ou en dehors (c'est grâce à toi qu'on pourra trinquer après ma soutenance). Je vous souhaite beaucoup de bonheur pour la suite, en France ou ailleurs (mais en Europe !!!)

Un grand merci aussi à toi, Pierre Yves, pour ces presque crises cardiaques dans le P2, ton aide fréquente, tes nombreux conseils et tes coups de gueule opportuns. Je te l'avais déjà dit (même si on pouvait remettre en cause ma parole à ce moment-là) mais je préfère le confirmer ici !

Je souhaite également remercier le reste de l'équipe, Hongwei mon singing post-doc préféré, pour les merveilleux souvenirs des Etats-Unis (O'Conors, Samuel Adams, chinatown, et bien sûr le lit King size), Lucas pour la collecte de diverses ressources, Flo pour ta gentillesse et tes conseils, Irène la sirène et Sophie la girafe pour détendre tous les jours l'atmosphère du bureau, Arnaud, lapin quelques matins, Magali qui gère aussi bien avec un bon de commande, une fourchette ou un verre à la main, Edwige source intarissable d'informations et de conseils utiles en Biomol notamment, Claire, la sérénité incarnée, pour ton aide de dernière minute.

Je voudrais également remercier les anciens membres de l'équipe, Suzy, Aga, pour vous être occupées de moi à mon arrivée et m'avoir appris énormément durant mes deux stages de Master ; mais également Virginie, pour m'avoir appris que la thèse était un marathon et non un sprint, Claire Ha-met-la Primocin, Murielle pour les nombreux échanges du temps où nous étions colocataires, Diana, Pierre-Marie...

Je continuerai en remerciant les habitués de fin de soirée de Noël, Fred, Charlie, Maïlys et Marion. Un grand merci à mes fournisseurs officiels de cigarettes Fred, Loulou et Stefan sans qui je n'aurais pas pu terminer mes expériences et l'écriture cette année... Fred et Loulou pour les bons moments sur les bancs de la Fac et plus récemment les chaises du labo. Fred également, pour le partage de nos angoisses de thésards dans la dernière ligne droite. Merci à Loulou pour toutes tes roulées et ces discussions autour du cerveau, de l'évolution, de l'anarchie et du métal. Tu m'as vraiment appris beaucoup de choses et j'adorerai toujours discuter et débattre avec toi, tu es vraiment éééénorme...

Merci à Bertrand Pain et à toute son équipe avec une mention particulière à Chrichri pour les leçons que tu m'as données en QPCR, R, Poker et lors de nos virées en moto. Merci à l'équipe de Peter Dominey, aux anciens et nouveaux GEEK, Maxime, Stéphane, Gregoire, Pierre, Xavier, etc, pour les bons moment passés au labo ou à l'extérieur. Je pense notamment aux soirées crêpes de Max et autres soirées déguisées, à nos débats sans fin avec Stéphane sur l'existence du hasard et de l'avenir de la robotique de « service ». Un merci plus professionnel à Maxime pour ton initiation au code et tes explications sur les statistiques. Merci à l'équipe d'Olivier Raineteau pour votre joie de vivre à 9h comme à 21h. Merci également aux autres équipes et plus particulièrement Christine, Véronique, Angèle, Julie, Pierre et Camille pour leur aide au microtome, confocal et immuno-marquage etc... Enfin, merci à Nico et Chandara, pour votre bonne humeur quotidienne et votre efficacité (même le jour du repas de Noël).

Je souhaite également remercier tous les membres de Plurabbit et tout particulièrement Zsuzsanna et Elen pour leur accueil chaleureux et leur sollicitude.

Je continuerai avec les anciennes de la Fac, Camille, Julie et Annabelle, pour tous ces bons moments depuis bientôt 10 ans au sham, à Cham et autres soirées révisions... Etant le dernier, l'irréductible étudiant, j'espère que ma soutenance sera à la hauteur des vôtres.

Un grand merci à mes coloc Steph, Lotte et Ben, qui m'ont vu grandir littéralement et qui m'ont supporté quotidiennement durant toutes mes études. Oui c'est fini, je ne m'inscrirai plus à la fac, promis.

Un grand merci à ma famille et plus particulièrement à mon frère pour avoir toujours su m'aider à me vider la tête quand il le fallait. Merci également à Belinda pour avoir toujours été là pour moi : merci d'avoir soutenu et aidé le petit garçon qu'elle a connu à poursuivre ses études jusqu'à Tokyo. A toi, si tu me lis, j'espère que tu es fier de moi. Merci à ma mère qui m'a toujours poussé plus loin, qui m'a soutenu tous les jours grâce à son surplus d'énergie (légendaire), et qui envers et contre TOUT a réussi à répondre présente durant cette dernière année. C'est grâce à toi si j'en suis là aujourd'hui et je t'en remercie du fond du cœur.

Je souhaite remercier enfin la famille Jouen-Thuillier pour m'avoir fourni le meilleur correcteur syntaxique, grammaticale et orthographique du marché. Je m'attarderai un peu plus longuement sur la fille, qui est probablement la seule personne à avoir lu 3/4 fois l'intégralité de ce manuscrit. Tu as été au cœur de l'action du premier au dernier jour de cette aventure (du Wallace à la salle de conf) et je voudrais commencer par te remercier pour ta patience et ta compréhension pour mes virées récurrentes avec Pierro au P2. Tu étais là pour partager les moments de joie mais aussi pour me remonter le moral lors des coups durs. Nous avons partagé nos thèses au labo aussi bien qu'à la maison, et je me rends compte aujourd'hui de la chance d'avoir quelqu'un avec qui échanger, qui comprend réellement ce que cela représente. Je te remercie particulièrement pour cette dernière année où tu as été ma cuisinière, ma rédactrice en chef, mon amie, mon tyran, ma boussole, ma coloc ou ma correspondante mais toujours ma compagne. Je te dois beaucoup, et je ne sais pas si j'aurais pu terminer sans toi. Je ne souhaite qu'une chose : que ces lignes marquent le début d'une nouvelle aventure à deux. 私はあなたを愛してる、わすれていけないはなちゃん!!!

Pour tous ceux qui liront ces quelques lignes, tatami et futon vous attendent au Japon.

## Résumé

Le lapin est utilisé comme animal modèle pour de nombreuses maladies humaines. Il est également utilisé comme bioréacteur pour la production de molécules biologiques dans le sérum et le lait. Un des problèmes clef dans la fabrication de lapins transgéniques, et par conséquent la création de modèles de maladies humaines et de bioréacteurs, est l'obtention de cellules souches pluripotentes (PSCs) capables de coloniser l'embryon préimplantatoire et de former des chimères germinales.

Deux états d'autorenouvellement des PSCs ont été définis, à savoir les états naïf et amorcé. De nombreuses différences existent entre ces deux états dont la plus marquante est la capacité unique des PSCs à l'état naïf, de coloniser l'embryon préimplantatoire et former des chimères.

L'objectif de mon projet doctoral a été d'étudier la pluripotence chez le lapin. Dans ce cadre, j'ai d'abord entrepris de fabriquer et de caractériser des cellules souches pluripotentes induites (RbiPSCs), puis d'évaluer leur capacité à coloniser l'embryon et à participer au développement.

Trois lignées de RbiPSCs dépendantes du FGF2 ont été obtenues suite à la reprogrammation de fibroblastes de lapin. Leur caractérisation moléculaire et fonctionnelle a révélé qu'elles possédaient certaines caractéristiques propres à l'état naïf de pluripotence : (i) la résistance à la dissociation à la trypsine, (ii) une forte activité de l'enhancer distale d'*Oct4*, (iii) l'expression de certains marqueurs spécifiques de l'état naïf. Cependant, l'analyse globale du transcriptome de ces lignées, couplée à leur incapacité à coloniser efficacement l'embryon préimplantatoire, permet de conclure qu'elles sont stabilisées à l'état amorcé de pluripotence.

La seconde partie de mon projet doctoral a consisté en la réversion des RbiPSCs vers l'état naïf de pluripotence. Dans ce but, j'ai surexprimé *KLF2* et *KLF4*, deux gènes appartenant au réseau de pluripotence naïf, et utilisé les conditions de culture des PSCs de souris. Les cellules ainsi obtenues, appelées EKs (Enhanced KLFs), présentent un profil d'expression plus proche de celui de l'ICM de lapin, dû notamment à la réactivation de marqueurs spécifiques de la pluripotence naïve. Enfin, les cellules EKs présentent une capacité accrue pour la colonisation de l'embryon préimplantatoire de lapin.

Mes travaux constituent le premier exemple de reprogrammation de cellules souches pluripotentes vers l'état naïf chez le lapin. Les cellules ainsi produites ouvrent la voie à la fabrication de chimères somatiques et germinales.

# Table des matières

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Le développement embryonnaire précoce .....</b>	<b>9</b>
1.1. La souris.....	11
1.2. L'homme.....	20
1.3. Le lapin .....	23
1.4. Les autres espèces .....	24
<b>2. Les cellules souches pluripotentes d'origine embryonnaire .....</b>	<b>28</b>
2.1. L'histoire de la dérivation des cellules souches embryonnaires.....	29
2.2. Le noyau de pluripotence.....	32
2.3. La souris.....	36
2.4. L'homme.....	42
2.5. Le lapin .....	46
2.6. Les autres espèces .....	48
<b>3. Les cellules souches pluripotentes induites .....</b>	<b>49</b>
3.1. La souris.....	49
3.2. L'Homme.....	52
3.3. Le lapin .....	53
3.4. Les autres espèces .....	53
3.5. Les différentes techniques et approches de reprogrammation cellulaire .....	54
<b>4. Les différents états de pluripotence .....</b>	<b>62</b>
4.1. L'état fondamental et l'état naïf de pluripotence .....	62
4.2. L'état amorcé .....	83
4.3. L'état transitoire 2C .....	89
4.4. L'état intermédiaire de pluripotence .....	93
4.5. La transition entre les différents états de pluripotence .....	97
<b>5. Le lapin comme modèle d'étude de la pluripotence.....</b>	<b>112</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>116</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>116</b>
<b>1. Les cellules souches pluripotentes chez le lapin.....</b>	<b>117</b>
1.1. Obtention des iPSCs de lapin.....	117
1.2. Caractérisation et comparaison des RbiPSCs et des RbESCs .....	117
<u>Article n°1 : Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in Rabbits.....</u>	119
<u>Article n°2 : Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency .....</u>	120

<u>Article n°3</u> : Contrasting transcriptome landscapes of rabbit pluripotent stem cells in vitro and in vivo	146
(Publié dans <i>Animal Reproduction Science</i> en juillet 2014 pages 67- 79).....	146
1.3. Comparaison moléculaire des PSCs chez le lapin .....	147
<u>Article n°4</u> : Transcriptome reconfiguration of rabbit induced pluripotent stem cells toward these of inner cell mass cells induced by Krüppel-like factors .....	148
<b>2. La réversion des RbiPSCs vers l'état naïf de pluripotence .....</b>	<b>149</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>151</b>
<b>1. Résultats complémentaires et discussion: .....</b>	<b>151</b>
1.1. Les différences observées entre RbESCs et RbiPSCs .....	151
1.2. L'état métastable chez le lapin.....	153
1.3. A quel niveau de pluripotence sont stabilisées les PSCs de lapin .....	155
1.4. La capacité de colonisation iPSCs de lapin .....	158
1.5. Comment définir les états de pluripotence chez le lapin .....	166
<b>2. Ouvertures .....</b>	<b>168</b>
2.1. Le cas particulier de la souris.....	168
2.2. Comment atteindre la pluripotence naïve chez les autres espèces ? .....	170
2.3. Perspectives.....	172
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>175</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>198</b>
<u>Annexes n°1</u> : Génération of rabbit pluripotent stem cell lines .....	198
<u>Annexe n°2</u> : A Short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency.....	199



## Table des figures

Figure 1 : Chronologie du développement embryonnaire précoce.....	10
Figure 2 : Formation des premiers lignages .....	13
Figure 3 : La voie Hippo dans la spécification TE / ICM. ....	14
Figure 4 : Balance de Cdx2/Oct4 dans la spécification TE/ICM. ....	15
Figure 5 : Mécanismes de spécification des trois premiers lignages dans l’embryon.....	17
Figure 6 : Schéma du développement embryonnaire post-implantatoire de souris.....	19
Figure 7 : Mécanismes de spécification des trois premiers lignages dans l’embryon.....	21
Figure 8 : Mécanismes de spécification des trois premiers lignages dans l’embryon.....	27
Figure 9 : Les cellules souches embryonnaires.....	31
Figure 10 : Le noyau de pluripotence.....	35
Figure 11 : Voies de signalisation impliquées dans l’autorenouvellement des mESCs.....	39
Figure 12 : Voies de signalisation impliquées dans l’autorenouvellement des hESCs.....	45
Figure 13 : La reprogrammation cellulaire.....	50
Figure 14 : Evènements majeurs de la reprogrammation. ....	58
Figure 15 : Mécanismes épigénétiques de la reprogrammation. ....	61
Figure 16 : Les différents niveaux de pluripotence. ....	63
Figure 17 : L’état naïf métastable.....	65
Figure 18 : Le milieu 2i/3i.....	68
Figure 19 : Origine embryonnaire des mESCs.....	71
Figure 20 : La balance FGF/Nanog.....	74

Figure 21 : L'action des 2i dans les mESCs .....	79
Figure 22 : L'état transitoire 2C.....	90
Figure 23 : Les différents états de pluripotence. ....	95
Figure 24 : Transition en l'état amorcé et l'état naïf chez la souris. ....	99
Figure 25 : Culture secondaire des RbiPSCs.....	154
Figure 26 : La culture des cellules EKs dans les conditions 2i/LIF .....	157
Figure 27 : La participation au développement des RbiPSCs chez le fœtus de lapin .....	159
Figure 28 : La capacité de participation au développement des EKs chez le fœtus de lapin ..	161
Figure 29 : Excision des transgènes Klf8 dans les cellules EKs.....	162
Figure 30 : L'auto-fluorescence des cellules sanguine chez le fœtus de lapin.....	165

## Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques comparées des cellules souches pluripotentes. ....	82
Tableau 2 : Caractéristiques comparées des cellules souches pluripotentes. ....	88
Tableau 3 : Caractéristiques comparées des cellules souches pluripotentes. ....	92
Tableau 4 : Caractéristiques comparées des cellules souches pluripotentes. ....	96
Tableau 5 : Les premières hPSCs révertées vers l'état naïf. ....	102
Tableau 6 : Conditions de culture des différentes hPSCs à l'état naïf. ....	104
Tableau 7 : Les marqueurs discriminant l'état naïf et amorcé chez le lapin et la souris. ....	167

## Liste des abréviations

AGZ	Activation du Génome du Zygote
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
DE	Distal Enhancer
DIA	Differentiation Inhibiting Activity
EBs	Embryoïd Bodies
EC	Embryonic Carcinoma cells
EG	Embryonic Germ cells
Epi	Epiblaste
EpiSCs	Epiblast Stem Cells
ERVs	Endogenous RetroVirus
ESCs	Embryonic Stem Cells
FBS	Fœtal Bovin Serum
FIV	Fécondation In Vitro
hESCs	human Embryonic Stem Cells
hiPSCs	human induced Pluripotent Stem Cells
HR	Homologous Recombination
Hypo	Hypoblaste
iPSCs	induced Pluripotent Stem Cells
ICM	Inner Cell mass
IVF	In Vitro Fecondation
KLF	Krüppel Like Factor
KO	Knock Out
KOSR	Knock Out Serum
LIF	Leukemia Inhibitor Factor
LTR	Long Terminal Repeat

MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
mESCs	mouse Embryonic Stem Cells
miPSCs	mouse induced Pluripotent Stem Cells
NHEJ	Non Homologous End Joining
NSCs	Neural Stem Cells
NT	Nuclear Transfer
OSKM	Oct4 Sox2 Klf4 c-Myc
PA	Phosphatase Alcaline
PE	Proximal Enhancer
PGCs	Primordial Germ Cells
PrE	Endoderme Primitif
PS	Primitive Streak
PSCs	Pluripotent Stem Cells
RbESCs	Rabbit Embryonic Stem Cells
RbiPSCs	Rabbit induced Pluripotent Stem Cells
RbiPSCs	Rabbit induced Pluripotent Stem Cells
TcFs	Transcription Factors
TE	Trophectoderme
TAX	Tamoxifène

# INTRODUCTION

*« L'important n'est pas de croire mais de douter. »*

Motoro Mase

私は私の母上とあぬりすにこの博士論文を捧げる

# INTRODUCTION

## 1. Le développement embryonnaire précoce

Chez les mammifères, le développement embryonnaire précoce regroupe les étapes du développement de la fécondation de l'ovule par un spermatozoïde à l'implantation dans l'utérus. L'embryon est alors entouré d'une membrane de glycoprotéines appelée zone pellucide. Cette dernière est sécrétée lors de la maturation de l'ovocyte par l'ovocyte lui-même ainsi que par les cellules de la *corona radiata*. La zone pellucide est nécessaire à la fécondation en permettant, notamment, une reconnaissance du spermatozoïde spécifique à l'espèce et d'assurer la migration de l'embryon vers l'utérus en l'empêchant de s'implanter dans l'oviducte, prévenant ainsi une grossesse extra-utérine. La fécondation entraîne la formation du deuxième globule polaire, marquant la fin de la deuxième division de méiose de l'ovule. La présence de ce 2<sup>ème</sup> globule polaire permet de distinguer l'ovule non fécondé de l'embryon au stade 1 cellule appelé zygote. La cellule œuf se divise pour donner successivement le stade 2, 4, 8 puis 16 cellules, alors appelées blastomères (Figure 1). Au stade 16 cellules, l'embryon est appelé morula (du latin *morus*) à cause de sa ressemblance avec une mûre. Aux stades 8 ou 16 cellules, on observe un rapprochement des cellules entre elles, on parle du stade morula compactée dans laquelle on ne distingue plus les cellules individuelles. Ensuite, au stade 16-32 cellules, il y a formation d'une cavité appelée blastocœle, par reflux de liquide et d'ions dans l'espace intercellulaire. Cette étape marque le début de la formation du blastocyste. Les divisions cellulaires jusqu'au stade blastocyste sont des clivages car le volume cytoplasmique total des cellules de l'embryon n'est pas modifié. Les cellules continuent de se multiplier et l'embryon grossit jusqu'à éclore, c'est-à-dire sortir de la zone pellucide. Après éclosion, l'embryon s'implante dans l'utérus pour poursuivre son développement.

Bien que ces étapes du développement soient partagées par tous les mammifères, il existe néanmoins des différences temporelles et moléculaires entre les différentes espèces. Pour cette raison, nous verrons en détails le développement de quelques animaux qui ont servi de modèles d'études.

La souris est le modèle principal utilisé depuis plusieurs décennies et il est encore utilisé par 59% des laboratoires dans le monde (EU report 2010). Ceci est dû, en grande partie, à la possibilité de générer des lignées de souris KO pour un gène afin d'en étudier le phénotype. Cela explique pourquoi la majorité des connaissances que nous avons sur le développement embryonnaire concerne la souris. Je commencerai donc par présenter le développement embryonnaire précoce chez la souris, ce modèle étant le plus étudié et le mieux compris actuellement. Cela permettra de poser les bases pour mieux appréhender le développement des autres espèces.

**Figure 1 : Chronologie du développement embryonnaire précoce.**

Cette figure représente les différentes étapes du développement embryonnaire préimplantatoire chez la souris (A), l'homme (B) et le lapin (C). AGZ : Activation du Génome du Zygote. (A-B) issu de (Katie Cockburn and Janet Rossant, 2010) ; (C) adapté de (Duranthon *et al.*, 2012)



## 1.1. La souris

- Généralités :

Chez la souris, le développement embryonnaire complet dure 21 jours. Après fécondation, l'embryon se divise rapidement et atteint : le stade 8 cellules à E2, morula à E2,5, blastocyste précoce à E3,5 et blastocyste tardif à E4-E4,5. L'activation du génome du zygote (AGZ) intervient très précocement, dès le début du stade 2 cellules, et est accompagnée de la dégradation des ARNm maternels. C'est au stade blastocyste tardif qu'a lieu l'implantation. Après le stade blastocyste, l'embryon pré-gastrula de souris forme un ovocylindre, ce qui diffère des autres mammifères comme l'homme, le lapin, le porc et le bœuf.

- Événements morphologiques :

C'est au stade 8 cellules qu'intervient le premier changement morphologique, la compaction. Le processus de compaction est en partie déterminé par le rapport nucléocytoplasmique. En effet, en enlevant du cytoplasme de la cellule œuf, on obtient une compaction anticipée au stade 4-8 cellules (Lee et al., 2001). D'autres résultats indiquent que le nombre de réplifications est important. En effet, en diminuant le nombre de cellules de l'embryon (en le coupant) ou en l'augmentant (agrégation avec un autre embryon du même stade), on obtient une compaction indépendante du nombre de cellules, qui se produit lors du 4<sup>ème</sup> cycle de divisions correspondant au stade 8-16 cellules pour un embryon intact (Pratt et al., 1981; Smith and McLaren, 1977). La cavitation, ou formation du blastocœle, est également dépendante du nombre de réplifications de l'ADN et non du nombre de cellules. Ainsi, en traitant l'embryon au stade 2, 4 ou 8 cellules avec de la cytochalasine, on inhibe le clivage cellulaire mais pas la réplication, et on peut observer tout de même la formation d'une pseudo cavité (Pratt et al., 1981). Lors de la compaction, les cellules créent des jonctions serrées et des jonctions adhérentes, notamment grâce au recrutement de la cadhérine E (Cad E), et des fibres d'actine F et de Myosine X (Ziomek, 1980). Un embryon dépourvu de Cad E maternelle ne se compacte pas au stade 8 cellules, alors qu'un embryon knock-out (KO) sur la *Cad E* ne forme pas de blastocyste à cause d'une mauvaise adhésion entre cellules (Cockburn and Rossant, 2010).

A partir de l'étape de compaction, il y a une polarisation apicale/basale des cellules qui est perpendiculaire à l'axe d'adhésion cellule-cellule. Il y a une réorganisation au niveau des membranes ainsi que du cytoplasme. La polarisation de ces cellules entraîne des divisions asymétriques des cellules qui influenceront leur devenir.

- **Formation des premiers lignages :**

Les premières cellules de l'embryon sont totipotentes, c'est à dire qu'elles ont la capacité de générer tous les lignages embryonnaires et extra-embryonnaires. Lors des premières étapes du développement, on passe de cellules totipotentes à trois lignages au stade blastocyste, le trophoctoderme (TE), l'épiblaste (Epi) et l'hypoblaste (Hypo) ou endoderme primitif (PrE) chez la souris. Au cours du développement, le TE forme le placenta, alors que le PrE forme le sac vitellin et l'endoderme extra embryonnaire pariétal. Les cellules de l'Epi présentes dans le blastocyste tardif sont à l'origine du futur fœtus *stricto sensu*.

La première spécialisation des cellules de l'embryon se fait entre le TE et la masse cellulaire interne (ICM) (Gardner, 1982). Les cellules de la morula compactée (8-16 cellules) sont polarisées et subissent les premières divisions asymétriques. Ainsi, les cellules situées à l'extérieur de la morula formeront le TE alors que les cellules à l'intérieur formeront l'ICM. Au stade morula, les cellules restent tout de même totipotentes et peuvent encore se spécialiser en TE ou ICM. En effet, il a été observé expérimentalement qu'intervertir la position interne/externe des cellules était susceptible de changer leur devenir.

La deuxième spécialisation concerne les cellules de l'ICM qui donneront l'Epi et le PrE. On peut identifier les cellules de l'Epi grâce à leur forte expression du gène de pluripotence Nanog (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003), alors que les cellules du PrE expriment Gata4/6, Pdgfra et plus tardivement Sox17 et Sox7 (Chazaud et al., 2006; Morrissey et al., 1996; Plusa et al., 2008; Rossant et al., 2003). En plus d'être des marqueurs de l'Epi et du PrE, Nanog et Gata4/6 sont des facteurs de transcription clefs responsables de la spécialisation des cellules dans ces deux lignages. Dans les premières cellules de l'ICM, on retrouve une co-expression de certains marqueurs des 2 lignages comme Nanog, Gata6 et Pdgfra (Plusa et al., 2008). Cependant, dans le blastocyste précoce (E3,5), l'expression de ces marqueurs est mutuellement exclusive, montrant que l'ICM contient les cellules précurseurs de l'Epi et du PrE. A ce stade, les précurseurs sont répartis de façon hétérogène. On parle alors de répartition en "poivre et sel" (Chazaud et al., 2006; Gerbe et al., 2008; Plusa et al., 2008), alors que l'on retrouve deux épithéliums bien séparés au stade blastocyste tardif. Le PrE est organisé en monocouche en position basale (du côté du blastocœle), alors que l'Epi est regroupé en amas entre le TE et le PrE. Deux hypothèses ont été formulées en ce qui concerne la détermination du devenir des cellules : soit celui-ci est influencé par leur position dans l'embryon, soit il est aléatoire. Bien que la répartition "poivre et sel" laisse penser que le devenir des cellules se ferait de manière aléatoire (Chazaud et al., 2006), on a montré que la position des cellules

aurait une importance. L'équipe de Zernicka-Goetz (Morris et al., 2010) a suivi par vidéo-microscopie les cellules lors du développement embryonnaire (Figure 2). Ils ont déterminé que, non seulement la position des cellules (interne/externe) était importante mais surtout que la vague de divisions asymétriques était prédominante. Lors de la première vague de divisions asymétriques, soit entre le stade 8 et 16 cellules, les cellules internalisées formeront dans 75% des cas des cellules de l'épiblaste. Les cellules internalisées lors de la 2<sup>ème</sup> (16-32 cellules) ou 3<sup>ème</sup> vague (32-64 cellules) de divisions asymétriques formeront du PrE dans respectivement 85% et 100% des cas. Par ailleurs, ils ont remarqué que des cellules dites bipotentes sont également présentes transitoirement après le premier cycle de divisions asymétriques (50%) (Morris et al., 2010), ce qui est en accord avec des études précédentes (Meilhac et al., 2009; Perea-Gomez et al., 2007). D'autres travaux ont montré que c'est par des mouvements dépendants de l'actine que les cellules migrent pour passer de l'organisation de type "poivre et sel" à celle de deux épithéliums superposés (Meilhac et al., 2009; Plusa et al., 2008). Dans la majorité des cas, les cellules migrent pour former deux tissus distincts. Il arrive également que des cellules "mal" positionnées rentrent en apoptose avant d'atteindre le stade blastocyste tardif E4,5 (Morris et al., 2010; Plusa et al., 2008)

### Figure 2 : Formation des premiers lignages

(A) Vidéo-microscopie et suivi des cellules d'un embryon de souris surexprimant la GFP, du stade 8-cellules au stade blastocyste (E4,5). Les cellules bleues représentent les cellules issues de la première vague de divisions asymétriques alors que les cellules rouges représentent celles issues de la seconde vague de divisions. (B) Immuno-marquage de la protéine Gata4 (marqueur du PE) d'un embryon au stade blastocyste, montrant que les cellules du PE forment une monocouche. (C) Représentation schématique du modèle de mise en place des trois premiers lignages dans l'embryon précoce. Issu de (Morris et al., 2010)

- Mécanismes moléculaires :

- Spécification TE/ICM ; Cdx2/Oct4

Lors de la compaction, les cellules extérieures sont polarisées. Il y a un enrichissement à la membrane apicale de différentes protéines comme : protéine Kinase C atypique (aPKC) (Pauken and Capco, 2000), la protéine de polarité Par3 (Plusa et al., 2005) et la protéine membranaire apicale Ezrin (Louvet et al., 1996). Cette polarisation apicale/basale induit une réponse mécano-sensorielle impliquant la voie Hippo (Nishioka et al., 2009). Dans les cellules externes, la faible activité de Hippo permet l'activation de la protéine *Yes-associated protein* (Yap) et son accumulation nucléaire. Dans le noyau, Yap forme un hétérodimère avec son cofacteur Tead4 et active la transcription du gène codant pour la protéine caudal-related homoeodomain protein (Cdx2) (Nishioka et al.; Yagi et al., 2007). Ce facteur de transcription est le régulateur clef induisant la spécialisation en TE (Niwa et al., 2005).

Dans les cellules internes de la morula, une forte activité de la voie Hippo permet d'activer les serine/thréonine kinases Lats1/2 qui phosphorylent la protéine Yap (Figure 3). Phospho-Yap est séquestrée dans le cytoplasme, ce qui conduit à une absence d'activation de Cdx2 (Nishioka et al., 2009). La localisation nucléaire de Yap apparaît ici comme le facteur déterminant de l'activation de Cdx2 et de la spécialisation des cellules en TE ou ICM.

**Figure 3 : La voie Hippo dans la spécification TE / ICM.**

Dans les cellules externes de l'embryon au stade morula, les protéines de la membrane apicale inhibent la voie Hippo conduisant à la translocation nucléaire de la protéine Yap. Dans le noyau, le couple Yap et TEAD4 active la transcription des gènes cibles. Dans les cellules internes de la morula, la voie Hippo active la kinase Lats 1/2 phosphoryle Yap conduisant à sa séquestration cytoplasmique. Issu de (Katie Cockburn and Janet Rossant, 2010)

Cdx2 active le gène *Eomesodermin* (*Eomes*). Strumpf *et al.* ont montré que son expression est limitée aux cellules externes de la morula et, plus tard dans le développement, aux cellules du trophoctoderme (Strumpf *et al.*, 2005). Une inactivation des gènes *Tead4*, *Cdx2* ou *Eomes*, entraîne une absence de formation du trophoctoderme (Figure 4). On peut noter que le phénotype des mutants pour ces gènes est plus sévère et intervient plus précocement pour *Tead4* que pour *Cdx2* (Nishioka *et al.*; Yagi *et al.*, 2007) et pour *Cdx2* que *Eomes* (Russ *et al.*, 2000; Strumpf *et al.*, 2005). Ceci confirme bien l'ordre d'activation de ces différents acteurs.

On sait aujourd'hui que la mise en place de l'ICM est dépendante de Oct4 (Nichols *et al.*, 1998), Sox2 (Nichols *et al.*, 1998 ; Avilion *et al.*, 2003) et Nanog (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003) qui forment le noyau de pluripotence. Au stade 8 cellules, toutes les cellules expriment Oct4, Sox2, Nanog alors que leur expression est restreinte à l'ICM au stade blastocyste précoce. Cette restriction est dépendante de Cdx2. En effet, chez le mutant pour *Cdx2*, les gènes *Oct4* et *Nanog* sont toujours exprimés dans les cellules du trophoctoderme (Ralston and Rossant, 2008).

Oct4 et Cdx2 sont deux facteurs de transcription qui s'inhibent mutuellement (Niwa *et al.*, 2005). L'activation de Cdx2 dans les cellules externes de la morula entraîne une inhibition d'Oct4 et restreint son expression dans les cellules internes qui donneront les cellules de l'ICM. Dans les cellules internes de la morula, Oct4, Sox2 et Nanog s'activent mutuellement et Oct4 inhibe l'expression de Cdx2, ce qui permet la formation de l'ICM. La balance d'expression entre Cdx2 et Oct4 est donc responsable de la mise en place du TE et de l'ICM.

**Figure 4 : Balance de Cdx2/Oct4 dans la spécification TE/ICM.**

Dans les cellules externes de l'embryon au stade morula, TEAD4 active la transcription de *Cdx2*. Cdx2 est le facteur de transcription clef induisant la spécification des cellules en TE. TEAD4 n'est pas actif dans les cellules internes de la morula. De plus, elles expriment Oct4 qui réprime Cdx2, induisant la spécification des cellules en ICM. Issu de (Flastbleep)

#### - Spécification Epi/PrE ; Nanog/Gata4/6

Chez la souris, la formation du PrE est dépendante du fibroblast growth factor (FGF) et notamment de FGF4 (Kang et al., 2013) qui est directement activé par le couple Oct4/Sox2 (Yuan et al., 1995). En effet, une mutation de FGF4 empêche la formation du PrE (Feldman et al., 1995). Ainsi, au stade blastocyste, toutes les cellules de l'ICM expriment Nanog (marqueur de l'Epi) et aucune n'exprime Gata 4/6 (marqueur du PrE).

La voie FGF passe par l'activation des Mitogen activated protein Kinases (MAPK). Lors de la fixation de FGF4 sur son récepteur à tyrosine kinase, il y a recrutement de l'adaptateur Grb2 qui active alors la petite protéine G Ras, responsable de l'activation des MAPK. En effet, dans un embryon KO pour *Grb2*, il n'y a pas de formation du PrE et toutes les cellules de l'ICM expriment Nanog (Chazaud et al., 2006). On dit que la formation du PrE est dépendante de la voie FGF/Grb2/Ras/MEK (Figure 5).

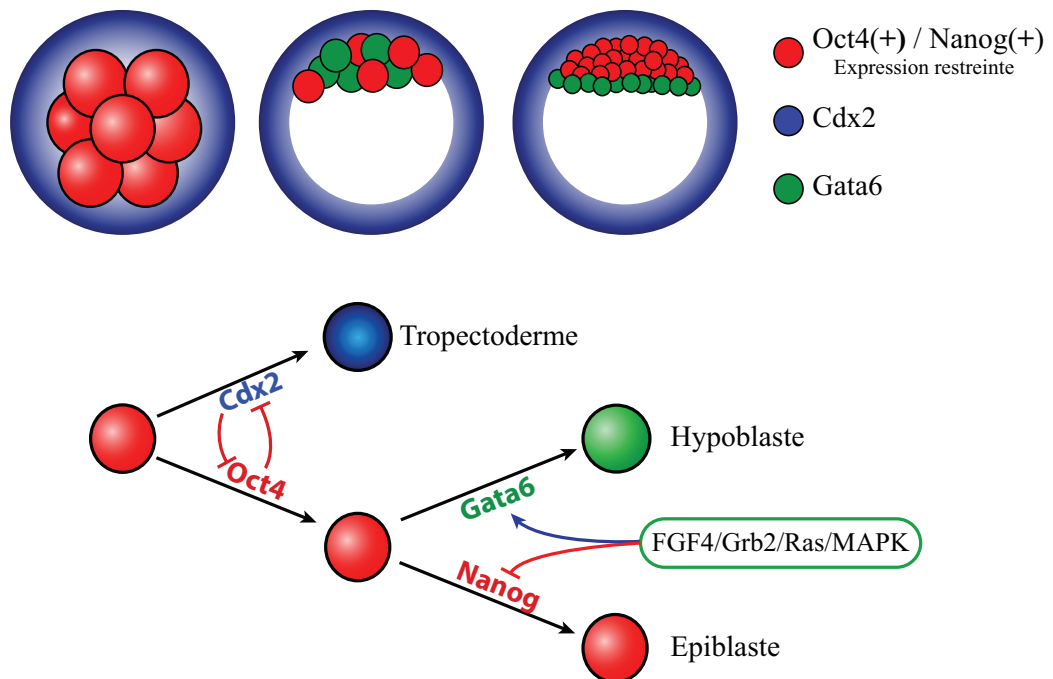
L'implication de cette voie a également été testée en utilisant des cocktails d'inhibiteurs spécifiques appelés 3i : le SU5402, inhibiteur du récepteur au FGF, le PD184352, inhibiteur des MEK, le Chir99021, inhibiteur de la Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) ; ou 2i : le PD0325901, inhibiteur des MEK + Chir99021. On peut noter que l'activation de la voie Wnt, mimée par l'inhibition de la GSK3 $\beta$  seule, n'a pas d'effet sur l'embryon (Nichols et al., 2009a). En revanche, les auteurs ont montré un effet synergique en combinaison avec l'inhibition de la voie FGF/MAPK (2i et 3i) (Nichols et al., 2009a). Ainsi, l'inhibition de la voie FGF/MEK seule réduit fortement le nombre de cellules GATA4/6+, alors que le traitement des embryons avec les 2i ou 3i empêche complètement la formation du PrE sans réduire le nombre de cellules composant l'ICM. Cela montre que l'inhibition de la voie FGF/Grb2/Ras/MEK, combinée à l'inhibition de la GSK3 $\beta$ , force toutes les cellules de l'ICM à former l'Epi au détriment du PrE (Nichols et al., 2009a). Ce phénotype, où 100% des cellules de l'ICM évoluent vers l'Epi, a également été observé dans des embryons *Fgf4*<sup>-/-</sup> (Kang et al., 2013) et *Grb2*<sup>-/-</sup> (Chazaud et al., 2006). En accord avec ces observations, lors d'un traitement avec du FGF4, on obtient le phénotype inverse avec 100% de cellules formant le PrE (Yamanaka et al., 2010).

Une analyse à l'échelle unicellulaire a permis de montrer que toutes les cellules de l'ICM expriment FGF4 ainsi que son récepteur FGFR2. Après la ségrégation de l'ICM, l'expression de FGF4 est restreinte aux cellules de l'Epi (Nanog+) et celle de FGFR2 aux cellules du PrE (Guo et al., 2010). Ce résultat laisse penser que les cellules de l'Epi sécrètent de manière paracrine le FGF4 et induisent ainsi la spécification de leurs voisines en PrE.

En résumé, la spécification de l'Epi et du PrE est dépendante de la balance NANOG et Gata4/6. En effet, Nanog et Gata4/6 ne sont pas que de simples marqueurs de l'Epi et du PrE mais sont les facteurs de transcription clefs, permettant la spécification de ces deux lignages. Nanog et Gata4/6 s'inhibent mutuellement, et la balance de l'expression de ces facteurs de transcription est influencée par la voie FGF/Grb2/Ras/MEK. On peut noter qu'une étude récente suggère une activation séquentielle des facteurs de spécification PrE, où Gata6 est le premier gène à être exprimé conduisant à l'activation de *Gata4* puis de *Sox17* et *Sox7* (Artus et al., 2011).

De ces différentes observations ressort le modèle suivant : dans l'ICM, les cellules Nanog+ activent FGF4 et répriment FGFR2 (Figure 5). De ce fait, les cellules Nanog+ sécrètent le FGF4 mais n'y sont que peu sensibles. Nanog inhibe Gata4/6 et permet la spécification en Epi. En revanche, la sécrétion paracrine de FGF4 soutient l'expression de Gata4/6 chez leurs voisines. Dans ces cellules, Gata4/6 inhibe Nanog et entraîne la spécification en PrE.

## Souris



**Figure 5 : Mécanismes de spécification des trois premiers lignages dans l'embryon.**

Schéma résumant la mise en place du TE, de l'épiblaste et de l'hypoblaste (PE) chez la souris. Adapté de (Kujik et al., 2008, 2012).

- L'embryon post implantatoire

Chez la souris, l'embryon s'implante au stade ovocylindre E5,5 correspondant à un embryon pré-gastrula (**Figure 6**). Le début de la gastrulation est marqué par l'apparition de la ligne primitive (PS) dans la région postérieure de l'Epi à E6,5. Les cellules de cette région subissent une transition épithélio-mésenchymateuse et s'invaginent pour former le mésoderme. Le mésoderme migre vers la région postérieure formant ainsi trois cavités au stade E7,5. Le fœtus se développe dans la chambre distale, le sac vitellin se forme dans la chambre intermédiaire et la chambre proximale participe à la formation du placenta.

Afin de déterminer le devenir et le rôle des différentes parties de l'embryon, des expériences de greffes ont été réalisées. Ainsi, la greffe de l'épiblaste total à différents stades (entre E5,5 et 7,5), dans les testicules ou la capsule rénale d'une souris immuno-déficiente, conduit à la formation de tératomes ([Beddington, 1983](#); [Diwan and Stevens, 1976](#)). De plus, la greffe ectopique de différentes parties de l'épiblaste E7,5 (proximale, distale, ligne primitive) induit également la formation de tératomes ([Beddington, 1983](#); [Tam, 1984](#)). L'analyse de ces tératomes suggère que les différentes régions de l'épiblaste ne présentent pas de différence dans leur potentiel de différenciation. De plus, des chimères post-implantatoires ont pu être produites *in vitro*, suite à la greffe d'une partie de l'épiblaste dans un autre embryon au même stade ([Beddington, 1981](#)). Les expériences de greffes ortho- et hétérotopiques de l'épiblaste ont permis de montrer que le devenir des cellules était contrôlé par le lieu de greffe et non par le lieu d'origine de l'épiblaste. L'ensemble de ces résultats indiquent que les cellules composant l'épiblaste conservent leur pluripotence jusqu'à 24h après le début de la gastrulation soit jusqu'au stade E7,5.



**Figure 6 : Schéma du développement embryonnaire post-implantatoire de souris.**

Illustration du développement embryonnaire de souris entre les stades embryonnaires E5,5 et E8,0. Il est indiqué le nombre moyen de cellules composant l'épiblaste. Abréviations : ALL: allantois, AMN: amnion, AVE: anterior visceral endoderm, BC: blastocyst cavity, DVE: distal visceral endoderm, ECT: ectoderm, EPI: epiblast, ExE: extraembryonic ectoderm, ICM: inner cell mass, MES: mesoderm, N: node, NF: neural fold, PAC: proamniotic cavity, PrE: primitive endoderm, PS: primitive streak, TE: trophectoderm, VE: visceral endoderm, ZP: zona pellucida.

## 1.2. L'homme

- Généralités :

Le développement embryonnaire humain reste mal connu, en grande partie, en raison des difficultés techniques et éthiques qui limitent l'obtention d'embryons humains et l'expérimentation sur ces derniers. Le développement embryonnaire total chez l'homme est de 9 mois, ce qui est environ 12 fois plus long que chez la souris. En revanche la chronologie du développement embryonnaire précoce est relativement proche, bien que plus lente. Les stades 2- et 4-cellules sont atteints respectivement à E1,5 et E2, comme chez la souris. A partir de ce stade, le développement est un peu plus long chez l'homme : 8-cellules à E2,5, 16-cellules à E3, 32-cellules à E4, blastocyste précoce à E5 et blastocyste tardif à E6-7 (contre E4,5 chez la souris). Après le stade blastocyste tardif, l'embryon humain continue de grossir en restant sphérique, alors que se forme un disque embryonnaire plat à sa surface (E6). L'embryon s'implante à E7-8. Ceci diffère de la souris où l'embryon forme un ovocylindre (E5,5). Une autre différence majeure est la compaction qui n'a lieu qu'au stade 16-cellules chez l'homme (8-cellules chez la souris). L'AGZ survient également plus tard que chez la souris au début du stade 8-cellules (2-cellules chez la souris).

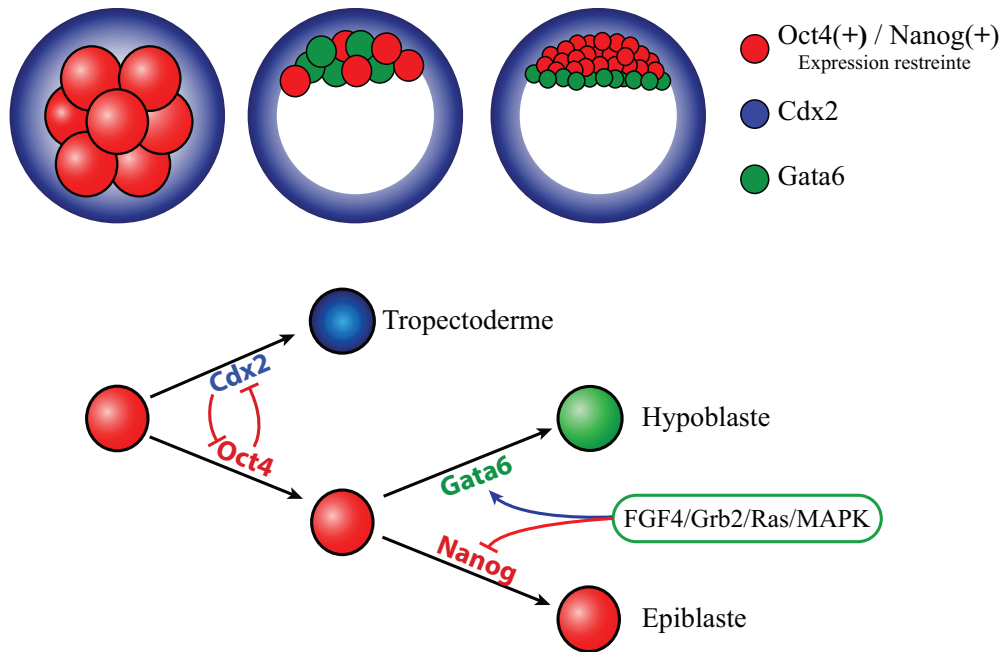
- Mécanismes moléculaires :

C'est en se basant sur les nombreux travaux réalisés sur l'embryon de souris que les différentes équipes ont abordé l'étude du développement embryonnaire des autres espèces. C'est pourquoi ils ont cherché l'expression des acteurs clefs (chez la souris) de la ségrégation des trois premiers lignages comme OCT4, CDX2, NANOG, et GATA4/6.

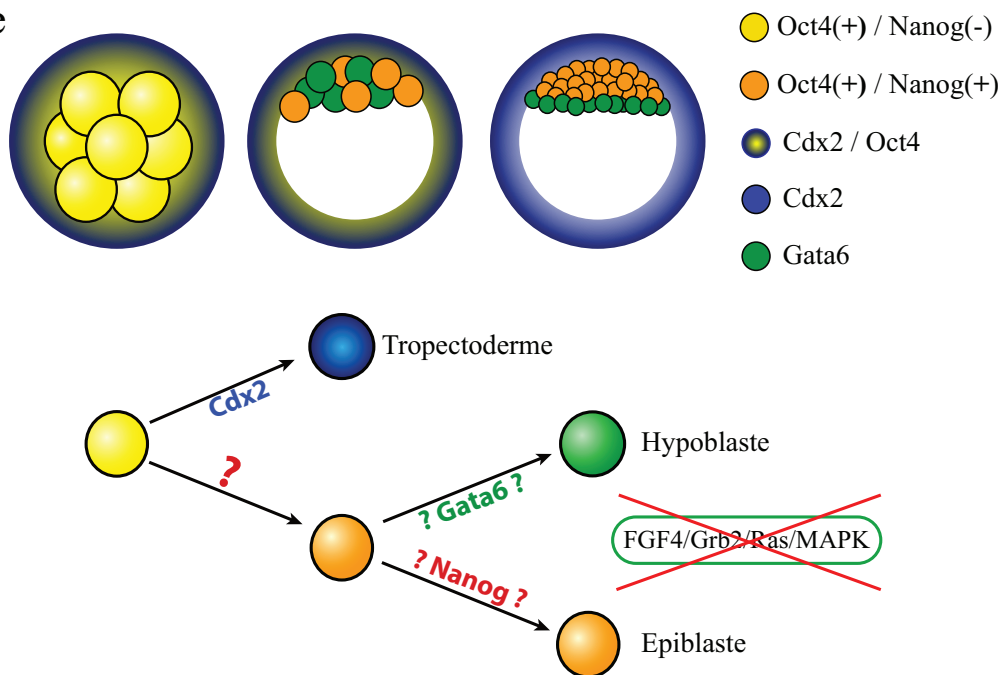
- Spécification TE/ICM ; CDX2/OCT4

Chez l'homme, OCT4 ne semble pas impliqué dans la spécification entre le TE et l'ICM (Figure 7). En effet, OCT4 est exprimé dans toutes les cellules de l'embryon même après formation du blastocyste, alors qu'il est restreint aux cellules de l'ICM dès le stade blastocyste précoce chez la souris (Cauffman et al., 2005). Chez l'homme, CDX2 est exprimé dans les cellules extérieures du blastocyste. En revanche, son expression ne débute qu'après la formation du blastocyste précoce à E5. La localisation mutuellement exclusive d'OCT4 et CDX2 laisse penser que leurs rôles seraient conservés avec la souris. Mais leur expression tardive (après formation du blastocyste) montre que les mécanismes d'induction de la spécification TE/ICM diffèrent, au moins temporellement, entre l'homme et la souris.

## Souris



## Homme



**Figure 7 : Mécanismes de spécification des trois premiers lignages dans l'embryon.**

Schéma comparant les mécanismes de mise en place du TE, de l'épiblaste et de l'hypoblaste chez la souris et chez l'homme. Adapté de (Kujik *et al.*, 2008, 2012).

#### - Spécification Epi/Hypo ; NANOG/GATA4/6

Chez l'homme, GATA6 semble être un meilleur marqueur de l'Hypo que GATA4 (Figure 7). En effet 95% des cellules positives pour GATA6 sont également positives pour GATA4. En revanche, GATA4 est aussi exprimé dans les progéniteurs de l'Epi exprimant NANOG (Kuijk et al., 2012). A E6, GATA6 est exprimé dans toutes les cellules de l'embryon (Roode et al., 2012). Il faut attendre E7 pour observer une ségrégation complète des cellules GATA+ et Nanog+ dans l'ICM, ce qui indiquerait que l'Hypo et l'Epi se spécifie à ce stade chez l'homme (Roode et al., 2012).

Les voies de signalisation contrôlant cette spécification Epi/Hypo chez la souris ont été testées chez l'homme. A l'inverse de la souris, la voie FGF/MEK ne semble pas impliquée. En effet, en présence d'un inhibiteur chimique du récepteur au FGF (PD173074), couplé ou non avec l'inhibiteur des MEK (PD0325901), des cellules GATA4+ ont pu être observées (Roode et al., 2012). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude (Van der Jeught et al., 2012). Les deux études montrent également que, contrairement à ce qui a été observé chez la souris, le traitement par les inhibiteurs de MEK et GSK3 $\beta$  (2i) n'empêche pas la formation de l'Hypo. Effectivement, des cellules GATA+ ont été observées dans le blastocyste tardif après traitement avec 2i alors qu'il empêche complètement la formation de l'Hypo chez la souris (Nichols et al., 2009a). Néanmoins, les conclusions des auteurs diffèrent quant à l'effet du traitement par le 2i. Dans la première étude, ne se basant que sur la présence de cellules exprimant GATA, les auteurs ont conclu à l'absence d'effet du 2i (Roode et al., 2012). Alors que Van der Jeught et al ont noté une augmentation du nombre de cellules NANOG et OCT4 positives lors du traitement combiné ou non des 2i (Van der Jeught et al., 2012).

### 1.3. Le lapin

Le lapin a été utilisé comme modèle principal du développement durant le XIX<sup>ème</sup> siècle mais est très peu étudié de nos jours (Fischer et al., 2012). Il reste cependant un animal modèle intéressant car il est phylogénétiquement plus proche des primates que ne le sont la souris et le rat (Graur et al., 1996). Sa gestation est relativement courte, 31 jours, et la chronologie du développement embryonnaire précoce est proche de la souris. Le stade 16-cellules est atteint à E2,5, blastocyste précoce E3,5, et blastocyste tardif à E4,5-5,5. Comme chez l'homme, la compaction intervient au stade 16-cellules alors que l'AGZ se produit comme chez le bœuf au début du stade 16-cellules (Manes, 1973; Telford et al., 1990). Une particularité de l'embryon du lapin est, qu'en plus de la zone pellucide, il est entouré d'une membrane épaisse de glycoprotéines appelée manteau muqueux. A E4, l'embryon de lapin dégrade la zone pellucide par digestion enzymatique puis en synthétise une nouvelle appelée neozona à E5, et la conservera jusqu'à l'implantation à E6,5 (Denker and Gerdes, 1979).

- **Mécanismes moléculaires :**

Très peu de travaux font état de l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant la ségrégation des premiers lignages chez le lapin. On peut remarquer que, comme chez l'homme, le bœuf et le porc, Oct4 est exprimé dans toutes les cellules de l'embryon et ce, même après la ségrégation du TE et de l'ICM au stade blastocyste précoce E3,5. A un stade plus tardif (E5,5), l'expression de Oct4 est restreinte aux cellules de l'Epi alors que seules les cellules du TE expriment Cdx2 (Maraghechi et al., 2013). Une étude suggère que, comme le bœuf et d'autres mammifères, la régulation d'Oct4/Cdx2 diffère de chez la souris (Berg et al., 2011). Une différence dans la séquence de l'enhancer distal d'Oct4 entre la souris et les autres espèces (porc, bœuf, lapin, homme, chien...) expliquerait le retard de l'extinction d'Oct4 dans le TE (Berg et al., 2011).

Chez le lapin, l'expression de Gata4 débute à E6 et augmente à E7 (Maraghechi et al., 2013). Comme chez le porc et le bœuf, l'expression de Gata4 est postérieure à la spécification de l'Hypo, rendant impossibles toutes conclusions quant à son rôle.

Comme pour les espèces présentées précédemment, on retrouve l'expression de gènes jouant un rôle clef dans le développement embryonnaire précoce chez la souris. Toutefois, leurs cinétiques d'expression semblent différentes de celle de la souris suggérant une régulation différente.

## 1.4. Les autres espèces

- Généralités :

Peu de données ont été publiées concernant l'étude du développement embryonnaire d'autres espèces de mammifères et, comme pour l'homme, les différentes études se sont basées sur le modèle de développement de la souris.

Le développement précoce porcin et bovin est relativement proche de celui de l'homme. En effet, chez le porc il y a formation du blastocyste précoce à E5,5, blastocyste tardif à E6,5 et épiblaste (après éclosion) à E7,5. Chez le bovin, la morula se forme à E5, le blastocyste précoce à E6, le blastocyste tardif à E8. L'AGZ du porc débute comme pour l'homme au début du stade 8-cellules, alors que celui du bovin, comme celui du lapin, commence plus tardivement au début du stade 16-cellules. Comme pour la majorité des espèces de mammifères, l'embryon forme un blastocyste sphérique, puis un disque embryonnaire plat à sa surface. Une différence majeure du développement précoce concerne l'implantation et la formation du placenta. En effet, le blastocyste préimplantatoire de bovin et de porc s'étire et s'allonge pour former un long filament de quelques millimètres de diamètre et pouvant atteindre jusqu'à 1 mètre de long au moment de l'implantation ([Kuijk et al., 2008](#)). Le placenta ainsi formé est de type épithéliochorial c'est à dire un placenta relâché et non invasif ([Carter and Enders, 2004](#)) alors que, chez les rongeurs et la majorité des primates, le placenta est de type hémochorial, c'est-à-dire qu'il présente une invasion de l'épithélium utérin pouvant atteindre les vaisseaux sanguins de la mère.

- Mécanismes moléculaires :

Chez le porc et le bovin, les mécanismes de mise en place du TE, Epi et Hypo ne sont pas encore compris et différent, pour la plupart, de ceux décrits chez la souris.

- Spécification TE/ICM ; Cdx2/Oct4

Comme chez l'homme, Oct4 ne semble pas impliqué dans la ségrégation entre le TE et l'ICM et est exprimé par toutes les cellules de l'embryon de porc et de bovin. Son expression n'est limitée aux cellules de l'ICM qu'au stade blastocyste tardif. En revanche, l'expression de Cdx2 est rapidement restreinte aux cellules du TE (Figure 8). Il semble par conséquent impliqué dans la spécification du TE chez le porc et le bovin (Kirchhof et al., 2000; van Eijk et al., 1999). Une étude chez le bovin rapporte que Cdx2 serait nécessaire au maintien du TE et non à sa formation (Berg et al., 2011). De plus, Cdx2 ne semble pas réprimer l'expression de Oct4, indiquant que d'autres mécanisme serait impliqué dans leur régulation (Berg et al., 2011). Chez le porc, une inhibition du récepteur au FGF induit une diminution du nombre total des cellules de l'ICM mais ne change pas la proportion de cellules formant l'Epi et l'Hypo (Rodriguez, 2012). En comparaison avec la souris, la voie FGF semblerait impliquée plus tôt dans le développement lors de la spécification du TE/ICM.

- Spécification Epi/Hypo et le rôle de Nanog/Gata4/6

Chez le bovin, une répartition hétérogène de Nanog a été observée dans les cellules de l'ICM, ce qui laisse supposer que le mécanisme de spécification de l'Epi serait proche de celui décrit chez la souris (Chazaud et al., 2006). En effet, Nanog est exprimé à partir du stade blastocyste précoce à E6 avec une forte expression au stade blastocyste tardif E7-8. En revanche, chez le porc, Nanog ne semble pas être impliqué. Aucune expression de *Nanog* au niveau de l'ARNm ou de la protéine n'a pu être détectée avant le stade épiblaste à E7,5 (Kuijk et al., 2012).

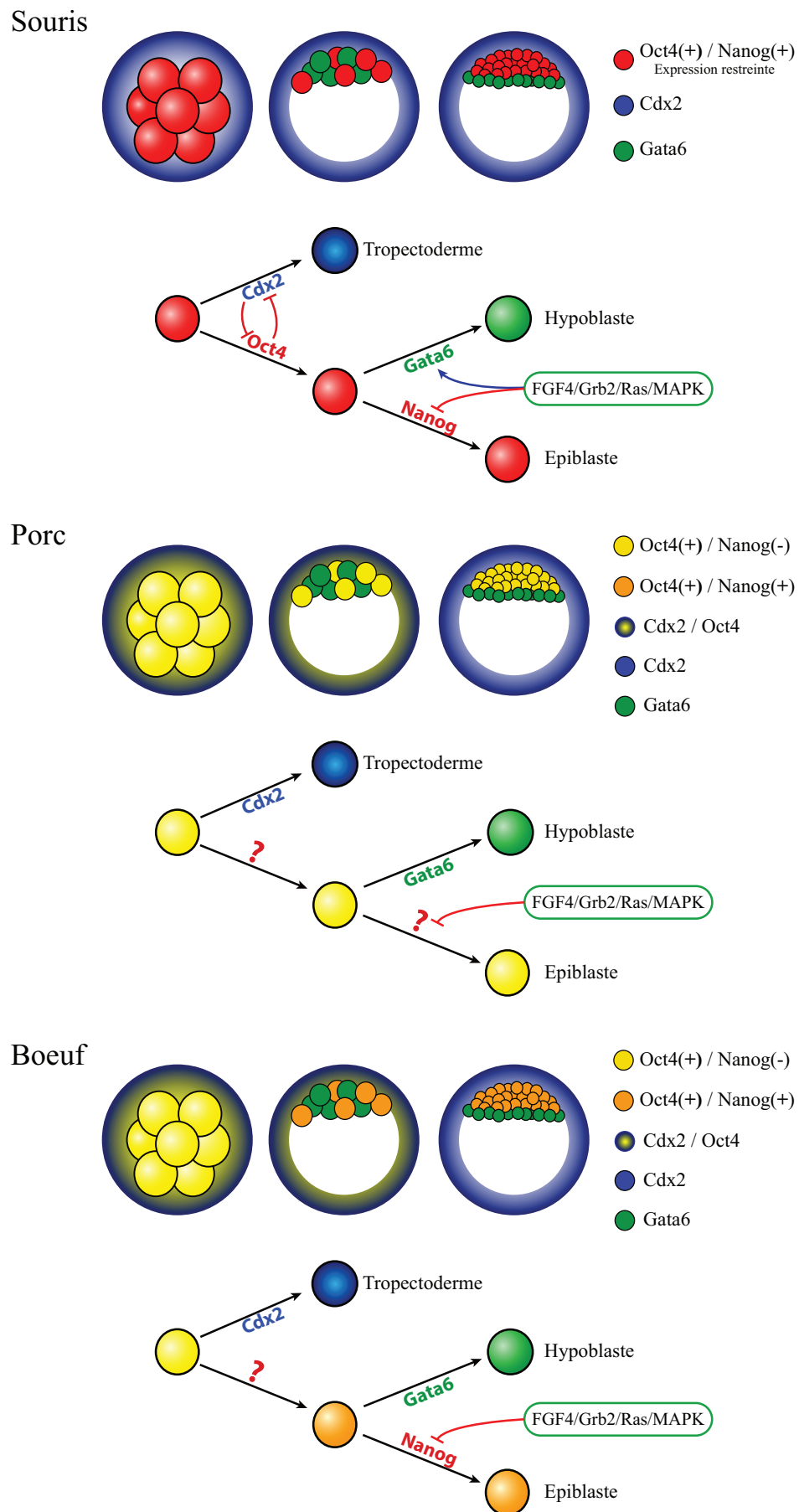
L'expression des facteurs Gata4/6 induisant la formation de l'Hypo chez la souris semble également être différente chez le porc et le bovin. Chez le porc, l'expression de Gata4 n'a pas pu être détectée au stade blastocyste précoce et tardif (Kuijk et al., 2008), mais seulement après éclosion au stade épiblaste (Rodriguez, 2012). Chez le bovin, Gata4 est exprimé dans les cellules de l'ICM et du TE (Kuijk et al., 2012). Cependant, chez le porc et le bovin, Gata6 est exprimé de manière hétérogène par les cellules de l'ICM du blastocyste précoce E5,5 (Kuijk et

al., 2008). On peut donc penser que Gata6 aurait seulement un rôle dans la spécification précoce de l'Hypo. De plus, la mise en place de l'Hypo ne semble pas contrôlée uniquement par la voie FGF/Grb2/Ras/MAPK (Figure 8). Une inhibition pharmacologique des MEK (PD0325901, PD98059) n'empêche pas la mise en place de l'Hypo mais réduit sensiblement le nombre de cellules positives pour Gata (Kuijk et al., 2012; Rodriguez, 2012). Cet effet partiel chez le bovin et le porc indiquerait qu'une autre voie que les MAPK serait impliquée dans la spécialisation en Hypo (Kuijk et al., 2012; Rodriguez, 2012). En présence du couple d'inhibiteurs 2i, l'activation de la voie Wnt ne semble pas avoir d'effet synergique, contrairement à ce qui a été montré chez la souris (Kuijk et al., 2012).

On peut noter que l'ajout de FGF4 n'a aucun effet. En revanche, un traitement des embryons aux FGF4 plus héparine induit la formation d'un blastocyste contenant 100% de cellules positives pour Gata chez le bovin (Kuijk et al., 2012) et chez le porc (Rodriguez, 2012).

Chez les autres espèces que la souris, les mécanismes moléculaires ne sont pas clairement établis et leur mise en place est plus tardive. L'expression des différents facteurs est souvent répartie dans tout l'embryon et n'est restreinte à une population de cellules qu'après formation des différents lignages embryonnaires. En conséquence, il est difficile de conclure sur la relation de cause à effet chez ces espèces.





**Figure 8 : Mécanismes de spécification des trois premiers lignages dans l'embryon.**

Schéma comparant les mécanismes de mise en place du TE, de l'épiblaste et de l'hypoblaste chez la souris, le porc et le bovin. Adapté de (Kujik *et al.*, 2008, 2012).

## 2. Les cellules souches pluripotentes d'origine embryonnaire

Les premières cellules de l'embryon, ou blastomères, sont dites totipotentes car elles peuvent donner toutes les cellules composant les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. Après la ségrégation des trois premiers lignages TE, Epi et Hypo, les cellules ont perdu cette capacité et ne sont donc plus totipotentes. A elles seules, les cellules de l'Epi vont former tout le fœtus et ont, par conséquent, la capacité de se différencier dans tous les lignages cellulaires composant un organisme adulte. La première spécification de ces cellules se fera lors de la gastrulation avec la mise en place des trois feuillets embryonnaires endoderme, mésoderme et ectoderme. On définit la pluripotence comme étant la capacité d'une cellule à se différencier dans tous les lignages des trois feuillets embryonnaires incluant la lignée germinale. Les cellules de l'Epi sont donc les premières et les seules cellules pluripotentes de l'embryon. En résumé, la différence fondamentale entre totipotence et pluripotence est la capacité ou non à générer les annexes embryonnaires.

Les cellules souches embryonnaires pluripotentes sont définies par deux caractéristiques principales, l'autorenouvellement et la pluripotence. L'autorenouvellement est la capacité d'une cellule à proliférer indéfiniment sans modification de ses potentialités. Contrairement aux cellules de l'Epi qui ne restent pluripotentes que quelques jours, les cellules souches pluripotentes, cultivées en présence de facteurs de croissance appropriés, peuvent être cultivées quasi indéfiniment *in vitro* tout en restant pluripotentes. La définition actuelle des cellules souches embryonnaires, et notamment la notion d'autorenouvellement, ont mis deux décennies avant d'émerger. Nous commencerons donc brièvement par l'histoire des découvertes qui ont conduit à l'obtention des cellules souches embryonnaires.

## 2.1. L'histoire de la dérivation des cellules souches embryonnaires

En 1952, Dixon et Moore ont découvert chez la souris des tumeurs particulières appelées tératocarcinomes, où l'on retrouve des cellules et des structures appartenant aux trois feuillets embryonnaires (Dixon & Moore 1952). Ce sont des tumeurs malignes développées majoritairement à partir des testicules au cours du développement embryonnaire. Deux ans plus tard, une autre équipe montra que la lignée 129 de souris consanguines développait très fréquemment ce genre de tumeurs (1% des fœtus) (Stevens and Little, 1954). Ces tumeurs peuvent se transmettre à d'autres souris par transplantation (Stevens, 1964), ce qui fit naître l'idée de cellules souches tumorales appelées cellules de Carcinome Embryonnaire (ECs). L'existence des EC et leur rôle ont d'ailleurs été démontrés la même année par la génération d'un tératocarcinome après transplantation d'une seule cellule dans une souris hôte (Kleinsmith and Pierce, 1964). L'origine des ECs a ensuite été étudiée plus en détail : la première hypothèse était que les ECs étaient issues de cellules souches germinales primordiales ou PGCs. Chez la souris, les PGCs colonisent les gonades entre E11 et E13. Or, on a montré que la transplantation ectopique des gonades d'un embryon à E11-13 induisait la formation d'un tératocarcinome chez la souris receveuse (Stevens, 1967a, 1970). Stevens confirma cette hypothèse en utilisant une lignée de souris doubles mutantes pour le gène *Steel* (Stevens, 1967b). En effet, chez ces mutants, les PGCs meurent avant de coloniser les gonades, et la transplantation de leurs gonades n'induit pas la formation de tératocarcinome. En parallèle, d'autres études montrèrent que la transplantation ectopique d'un embryon au stade ovocylindre pouvait également générer un tératocarcinome (Solter et al., 1970). Cette découverte souleva la question de l'origine commune des PGCs et des cellules de l'épiblaste ainsi que de leur lien avec les cellules ECs.

Il s'en suivit la première dérivation et culture *in vitro* de lignées de cellules ECs (Finch and Ephrussi, 1967; Kahan and Ephrussi, 1970). D'autres travaux montrèrent également que l'utilisation de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) comme cellules nourricières, empêchait la différenciation spontanée des cellules ECs (Evans, 1972; Martin and Evans, 1974, 1975). En conséquence, il était également possible d'induire la différenciation des cellules ECs en retirant les MEF. L'étude *in vitro* des cellules ECs permit de trouver de nombreuses similarités avec les cellules de l'ICM. Pour cette raison, différents laboratoires eurent l'idée de réinjecter les ECs dans un embryon et de le transférer dans une souris pseudo gestante (Brinster,

1974; Mintz and Illmensee, 1975; Papaioannou et al., 1975). Étonnamment, les cellules ECs purent générer des souris chimériques et donc participer à la formation de tissus sains et fonctionnels. De là, est apparue l'idée que les ECs représentaient l'équivalent malin des cellules de l'ICM.

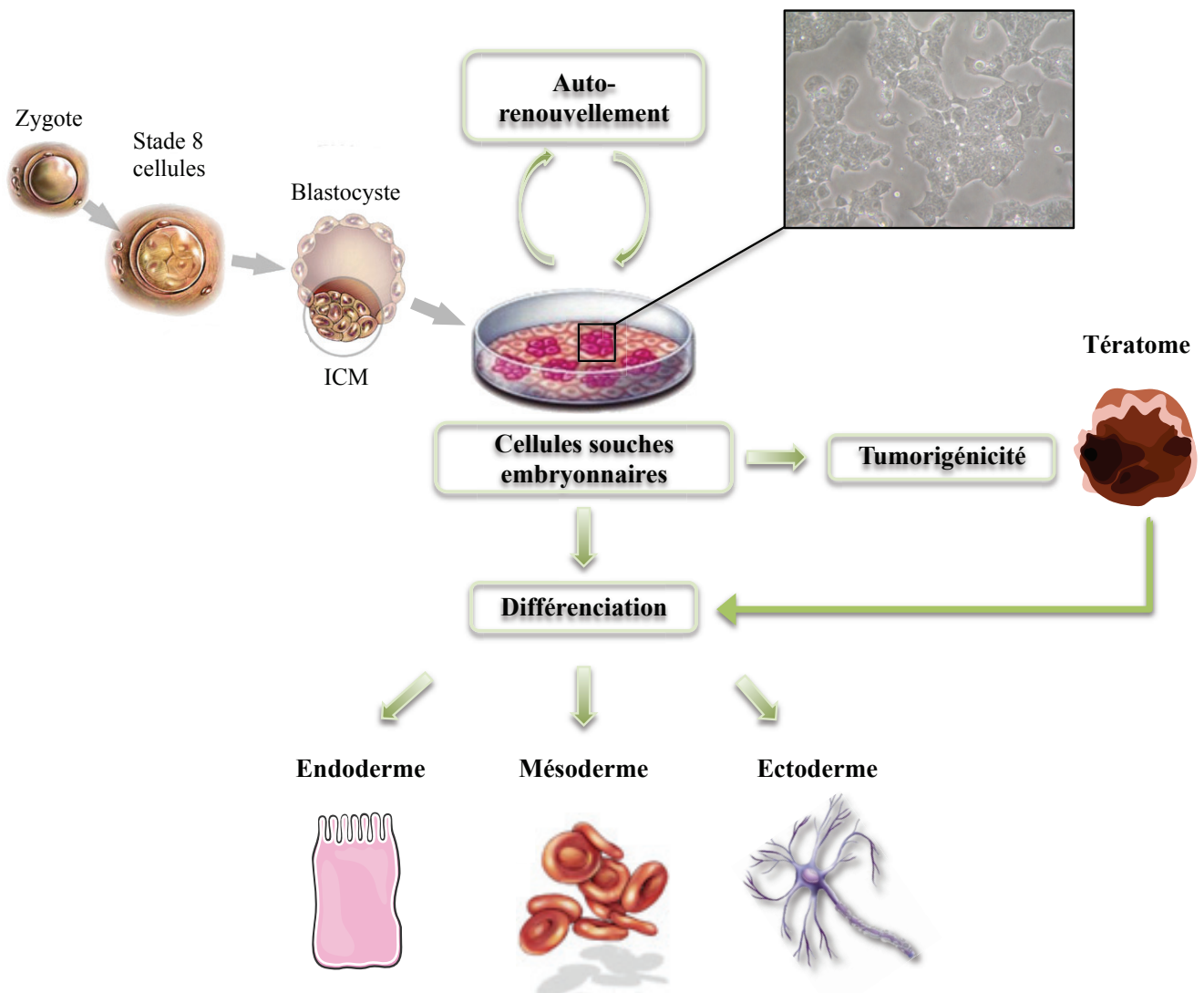
Forts de cette idée, Evans, Kaufman et Martin décidèrent de mettre en culture les cellules de l'ICM, obtenant ainsi les premières lignées de cellules souches embryonnaires (ESCs) de souris (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Pour maintenir les ESCs *in vitro*, ils utilisèrent les mêmes conditions de culture que pour les cellules ECs (Martin, 1981).

Les ESCs présentent de nombreuses caractéristiques communes avec les cellules ECs. En effet, bien que les ESCs ne présentent pas de mutations génétiques, elles sont également capables de former des tératomes lors d'une transplantation ectopique (Figure 9).

Il est important de noter que toutes les lignées de souris ne sont pas permissives à la dérivation de cellules. De plus, les premières ESCs ont été dérivées à partir d'embryons de la lignée 129, cette même lignée qui a été identifiée comme très favorable au développement de tératocarcinome. Il semble donc qu'il y ait une corrélation entre la permissivité des lignées de souris à la dérivation de ESCs et leur prédisposition à développer des tératocarcinomes.

Bien plus que des conditions de culture, l'obtention de lignées de cellules ECs a apporté la notion de cellules souches et celle d'autorenouvellement aux embryologistes de l'époque. En effet, l'idée même de cellules souches embryonnaires n'existait pas alors, car les cellules n'étaient présentes que transitoirement dans l'embryon avant de se différencier. On parlait généralement de progéniteurs ou de précurseurs pour qualifier les cellules de l'embryon.

Enfin, est apparue également la notion de lien ou d'origine des cellules ESCs, PGCs, ECs, ICM, Epi, notion qui reste encore aujourd'hui au centre des interrogations et des débats.



**Figure 9 : Le cellules souches embryonnaires.**

Schéma résumant les différentes caractéristiques des cellules souches embryonnaires : (i) l'autorenouvellement est la capacité à se multiplier indéfiniment ; (ii) la pluripotence est la capacité à se différencier dans les lignages de trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme), (iii) La tumorigénicité est la capacité des ESCs à générer des tératomes.

## 2.2. Le noyau de pluripotence

Avant de présenter les différentes cellules pluripotentes, il semble important d'introduire la notion de noyau de pluripotence. Ce noyau de pluripotence est commun à toutes les PSCs et permet de maintenir ces dernières en autorenouvellement et d'assurer leur pluripotence. Les premiers gènes à avoir été identifiés comme appartenant au noyau de pluripotence sont *Oct4*, *Sox2* et *Nanog*. Ils représentent le cœur de régulation du réseau de pluripotence et sont exprimés par toutes les cellules pluripotentes observées à l'heure actuelle.

Oct4 pour Octamer-binding transcription factor 4 est également appelé Oct3 ou POU5F1 pour POU domain class 5 transcription factor 1. *Oct3/4* est le gène codant un facteur de transcription à homéodomaine de la famille POU (Pict, Oct et Unc) et représente le facteur central du noyau de pluripotence. Son expression est strictement limitée aux cellules de l'embryon précoce comme les blastomères, les cellules de l'ICM et de l'Epi (Rosner et al., 1990), aux cellules germinales PGC et EG (Rosner et al., 1990; Schöler et al., 1990) ainsi qu'aux cellules ES (Okamoto et al., 1990). Dans ces différents types cellulaires, l'activation de Oct4 est contrôlée par différentes régions de son promoteur. La région distale de l'enhancer (DE) est active dans les cellules de l'ICM, les mESCs et les PGC alors que la partie proximale de l'enhancer (PE) est active dans les cellules de l'épiblaste post-implantatoire (Yeom et al., 1996).

Comme cela a été expliqué dans le chapitre précédent, dans l'embryon précoce Oct4 est nécessaire pour la mise en place de la pluripotence et la formation de l'ICM (Nichols et al., 1998). Dans les mESCs, Niwa *et al.* ont montré qu'un niveau d'expression précis de Oct4 était nécessaire pour assurer l'autorenouvellement (Niwa et al., 2000). En utilisant un système d'expression conditionnel, les auteurs ont montré qu'une réduction de moitié du niveau d'expression du gène *Oct4* induisait une perte de la pluripotence et une différenciation des mESCs en trophectoderme. A l'inverse, une augmentation de seulement deux fois du niveau d'expression de Oct4 induit une différenciation en endoderme primitif et mésoderme.

Oct4 peut former des homodimères dont l'activité et les cibles peuvent être modulées par phosphorylation sur la Serine 229 et la Tyrosine 327 (Plath et al., 2009). Dans les cellules ES, Oct4 peut également former des hétérodimères avec les facteurs de transcriptions EA1-like (Schöler et al., 1991) and Sox2 (Ambrosetti et al., 1997).

Sox2 pour SRY-related HMG-box (High Mobility Group) gene 2. Le facteur de transcription Sox2 a également été identifié comme étant nécessaire à la mise en place des

cellules de l'ICM (Avilion et al., 2003). Le KO de *Sox2* n'est létal pour l'embryon qu'après le stade post-implantatoire car les ARNm maternels compensent provisoirement l'absence d'expression zygotique (Avilion et al., 2003). Lors de la dérivation de l'ICM d'embryon *Sox2*<sup>-/-</sup>, les cellules obtenues se différencient spontanément en cellules géantes du trophoctoderme (Avilion et al., 2003). Cette observation a été confirmée en utilisant des mESCs *Sox2*<sup>-/-</sup> (Masui et al., 2007). L'hypothèse des auteurs pour expliquer ce phénomène est que *Sox2* serait responsable de l'activation de facteurs de transcription comme Nr2b2 (RXRβ), Nr5a2 et Nr5a1 (SF1), qui soutiennent et activent Oct4. L'absence de *Sox2* entraînerait une baisse de l'expression de ces facteurs qui diminuerait en retour l'expression de Oct4 et induirait la différenciation en trophoctoderme (Masui et al., 2007). Cette hypothèse est cohérente avec les observations faites par Niwa et al., où une diminution de moitié du niveau d'expression de Oct4 entraîne une différenciation des mESCs en cellules du TE (Niwa et al., 2000). A l'inverse, une augmentation de *Sox2* d'un facteur 2 diminue l'expression de Oct4 et Nanog et induit la différenciation des mESCs en neur ectoderme (Kopp et al., 2008).

En plus de soutenir l'activation de Oct4, *Sox2* forme des hétérodimères avec Oct4 pour activer le réseau de pluripotence. Ainsi, la majorité des gènes cibles possèdent dans leur enhancer un double motif juxtaposé *cis*-régulateur HMG-POU (Oct4-*Sox2*). On retrouve ce double motif conservé chez tous les euthériens depuis 250 millions d'années (Rodda et al., 2005). Un simple espacement de ces deux sites d'accroche par insertion de paires de bases réduit fortement l'activation des gènes cibles par le complexe Oct4/*Sox2* (Ambrosetti et al., 1997). Ainsi, pour le promoteur de *FGF4*, l'ajout de 2 et 3 paires de bases réduit respectivement l'expression du gène de 50% et 95%.

En plus de s'activer mutuellement, Oct4 et *Sox2* activent Nanog, le troisième acteur composant le noyau de pluripotence (Rodda et al., 2005).

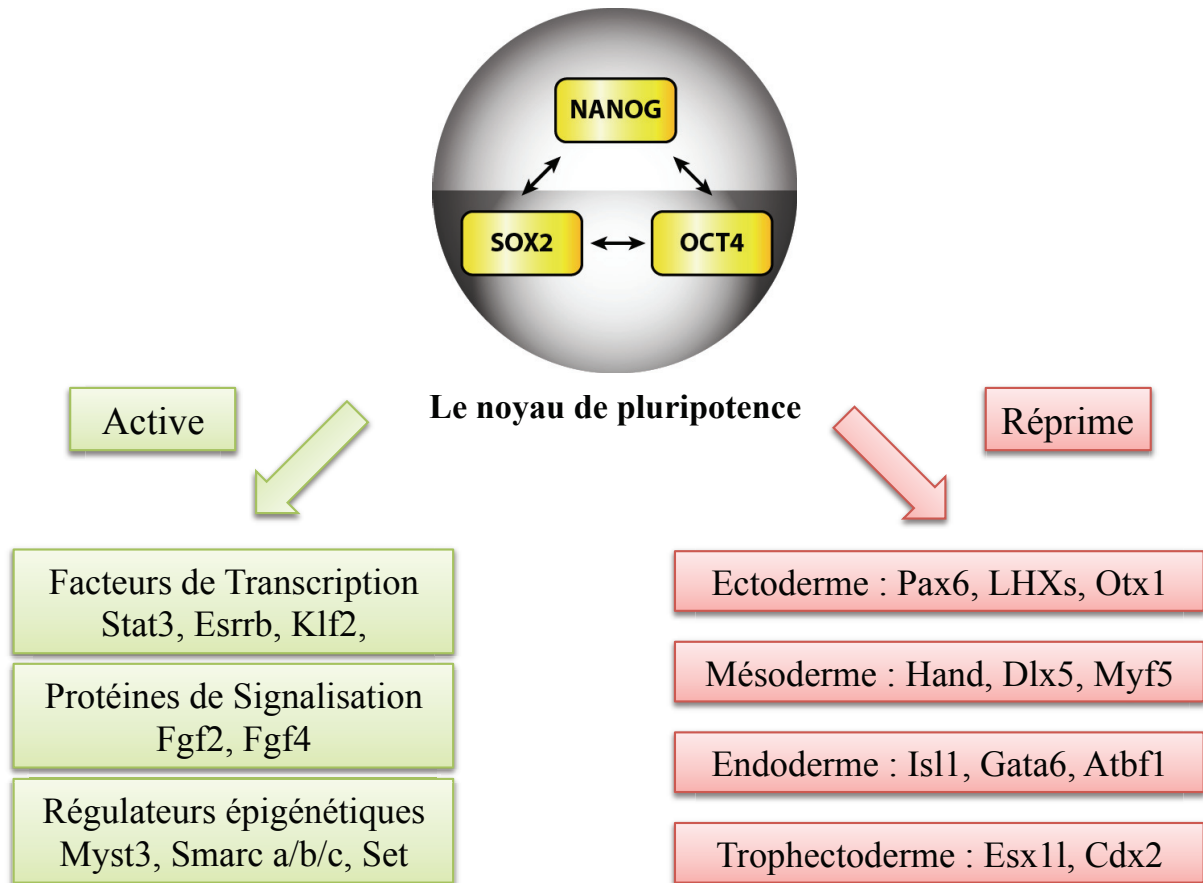
Comme Oct4, Nanog est un facteur de transcription à homéodomaine dont l'expression est également limitée aux cellules souches pluripotentes. Dans l'embryon, l'expression de Nanog est limitée aux cellules de l'ICM et permet la spécification des cellules de l'Epi (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). En effet, dans l'embryon de souris *Nanog*<sup>-/-</sup>, toutes les cellules de l'ICM forment du PrE exprimant *Gata4/6*, au détriment de l'Epi (Mitsui et al., 2003). Dans les mESCs, Nanog est exprimé à un niveau élevé alors que son expression diminue lors de la différenciation. La surexpression de Nanog dans les mESCs permet le maintien des cellules à l'état indifférencié, et ce, même en absence de l'activation de la voie LIF (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). A l'inverse, des mESCs *Nanog*<sup>-/-</sup> peuvent être maintenues en culture

(Chambers et al., 2007). Nanog n'est pas une cible directement activée par Stat3, et au vu de ces résultats semble agir en parallèle de la voie LIF. Cette idée est renforcée par le fait que Nanog partage de nombreuses cibles communes avec Stat3, l'effecteur principal de la voie LIF (Bourillot et al., 2009).

Ces trois facteurs clefs s'auto-activent et s'activent mutuellement créant une boucle de contrôle positive. Ils composent le noyau de pluripotence et sont au cœur de la régulation de l'autorenouvellement et du maintien de la pluripotence dans l'embryon, ainsi que dans les ESCs. L'analyse bio-informatique ou par immuno-précipitation de chromatine, a montré que la majorité de leurs cibles sont redondantes (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006; Zhan et al., 2005). Ils activent de nombreux modulateurs qui permettent de maintenir les cellules à l'état indifférencié (Figure 10). Parmi eux, on retrouve d'autres facteurs de transcriptions soutenant la pluripotence (Stat3, Zic3, Rest et Hesx1) ainsi que des modificateurs épigénétiques (Smarcad1, Myst3 et Set) (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006). Le noyau de pluripotence intervient également dans l'inhibition de gènes impliqués dans la différenciation en endoderme (Isl1 et ATBF1), mésoderme (Myf5, Hand1) et ectoderme (Hoxb1, Pax6, Otx1) (Boyer et al., 2005).

En résumé, le noyau de pluripotence régule le réseau de pluripotence qui soutient l'autorenouvellement et réprime les inducteurs de différenciation.





**Figure 10 : Le noyau de pluripotence.**

Le noyau de pluripotence est composé de trois facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog qui s'activent mutuellement. Le noyau de pluripotence soutient l'autorenouvellement des PSCs en activant d'autres facteurs de transcription formant le réseau de pluripotence d'une part et en réprimant les gènes responsables de la différenciation dans les différents lignages d'autre part.

## 2.3. La souris

Depuis l'obtention des premières ESC en 1981, un autre type de cellules souches pluripotentes a pu être stabilisé en culture, appelé Epiblast Stem Cells ou EpiSCs. Ces deux types de cellules souches pluripotentes de souris seront présentés séparément.

### 2.3.1. Les cellules ES

- Caractéristiques cardinales

Les cellules souches embryonnaires de souris (mESCs) ont permis de définir les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des cellules pluripotentes. Comme toutes les cellules pluripotentes, les mESCs prolifèrent en formant des colonies de cellules très serrées entre elles. Dans le cas des mESCs, les colonies sont en forme de dôme. Les mESCs présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, ce qui est probablement dû à leur cycle cellulaire particulièrement rapide (12h-16h). Les mESCs sont stables génétiquement, elles peuvent être cultivées plusieurs mois sans présenter d'anomalies génétiques ou chromosomiques. Elles présentent une forte activité télomérase, permettant leur culture à long terme sans atteindre de sénescence répllicative. Les mESCs ont une forte activité de la phosphatase alcaline, elles expriment des marqueurs de surface spécifiques comme Stage specific early antigen 1 (SSEA1), la molécule d'adhésion Cad E (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Les mESCs supportent très bien la dissociation enzymatique à la trypsine ainsi que l'ensemencement en cellule unique. Elles ont également un taux de clonogénicité proche de 100%. De plus, tout comme pour les cellules de l'ICM, seul le DE d'Oct4 est actif dans les mESCs (Yeom et al., 1996). Une autre caractéristique propre aux mESCs concerne le statut des chromosomes X dans les lignées femelles. On observe les deux chromosomes X actifs (XaXa) à l'état indifférencié alors qu'on observe l'inactivation aléatoire d'un chromosome X (XaXi) très tôt dans le processus de différenciation (Leahy et al., 1999; Monk, 1981).

Une autre particularité des cellules ES de souris concerne les modifications épigénétiques d'histones. La triple méthylation de la Lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) est une marque activatrice (Santos-Rosa et al., 2003; Sims et al., 2005) alors que la triple méthylation de la Lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) est une marque répressive (Francis et al., 2004; Ringrose et al., 2004). La particularité des mESCs est que l'on retrouve sur un même gène les deux marques à la fois, appelées "marques bivalentes" (Bernstein et al., 2006). H3K4me3

permet de recruter le complexe d'initiation de transcription alors que H3K27me3 bloque l'élongation, empêchant la transcription. Tous les acteurs nécessaires à la transcription sont déjà présents mais bloqués. Les auteurs parlent d'un état "prêt pour l'action" (Bernstein et al., 2006). Ces marques bivalentes sont principalement retrouvées sur les gènes de développement. Ainsi, lors de l'initiation de la différenciation, les gènes spécifiques des lignages peuvent être activés très rapidement.

Il existe plusieurs tests permettant de démontrer la pluripotence des mESCs. Les mESCs sont capables de se différencier dans les lignages des trois feuillets embryonnaires lors de la formation de corps embryoïdes (EBs). Une culture de cellules non adhérentes, par exemple en gouttes, permet la formation de structures en trois dimensions appelées EBs. Dans ces structures, les cellules vont "mimer" le développement embryonnaire et se différencier dans des lignages des trois feuillets embryonnaires. Un autre test porte sur la capacité des cellules à former un tératome. L'injection de mESCs dans les testicules ou la capsule rénale d'une souris immunodéficiente conduit à la formation d'un tératome. Dans cette tumeur les cellules se différencient dans les lignages appartenant à l'endoderme, au mésoderme et à l'ectoderme (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981).

La dernière caractéristique propre aux mESCs concerne leur capacité à générer des souris chimériques. Lors de l'injection de mESCs dans un embryon du stade 8 cellules au stade blastocyste, les mESCs ont la capacité de coloniser l'ICM et de participer au développement embryonnaire. L'individu sera donc composé en proportions variables de cellules issues de l'embryon et de cellules issues des mESCs. On parle de chimères somatiques lorsque les mESCs ne participent pas à la formation de la lignée germinale, et de chimères germinales le cas échéant. Les premières chimères germinales obtenues en utilisant des mESCs datent également des années 80 (Bradley et al., 1984; Evans et al., 1985; Robertson et al., 1986). Cette capacité à produire efficacement des chimères germinales a été particulièrement utilisée ces 30 dernières années. De plus, dans les mESCs le mécanisme de réparation de l'ADN par Recombinaison Homologue HR est privilégié au détriment du mécanisme de "non homologous end joining" NHEJ (Doetschman et al., 1988a; Thomas and Capecchi, 1987). Cette particularité a permis de développer les techniques de modifications génétiques ciblées comme le Knock-in et le Knock-out. C'est la combinaison de ces deux capacités qui a fait de la souris un outil incontournable et l'animal modèle le plus utilisé à l'heure actuelle.

- **Maintien de l'autorenouvellement :**

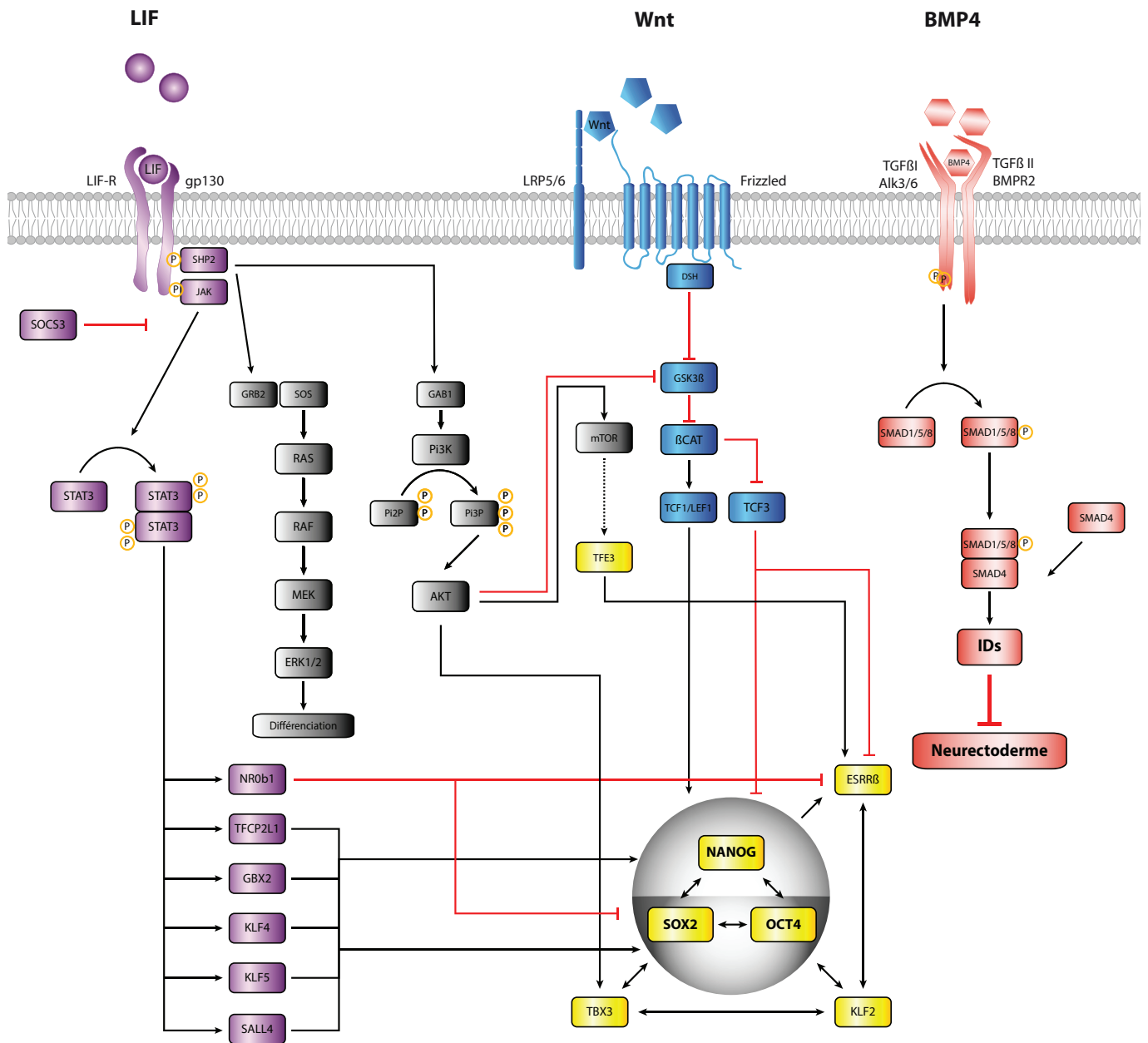
Les premières cellules ES de souris ont été cultivées en présence de FBS sur MEF ou sur gélatine dans du milieu conditionné par les cellules nourricières (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Dès lors, apparut l'idée que les MEF sécrétaient une molécule soluble avec une Activité inhibitrice de Différenciation (DIA), qui fut identifiée par la suite comme étant le LIF (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Le LIF est sécrété par les MEF sous deux formes : la forme soluble ainsi qu'une forme liée à la matrice extracellulaire (Rathjen et al., 1990). En présence de LIF, les mESCs peuvent être cultivées en l'absence de cellules nourricières.

Le LIF permet l'activation de 3 cascades de signalisation dont (a) la voie principale Jak/Stat3 (Boeuf et al., 1997; Niwa et al., 1998), (b) la voie SHP2/Ras/MAPK (Burdon et al., 1999), (c) la voie Pi3K (Paling et al., 2004) (Figure 11) :

a) La fixation du LIF sur son récepteur (LIFR+gp130) entraîne la dimérisation de ses deux sous-unités. gp130 recrute et active Janus Associated tyrosine Kinase (JAK) en la phosphorylant (Niwa et al., 1998). JAK phosphoryle en retour gp130 sur le site d'encrage Src Homology 2 (SH2) permettant le recrutement de Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (Stat3), qui est l'effecteur principal de la voie LIF (Stahl et al., 1995). La fixation de Stat3 sur gp130 permet la phosphorylation de Stat3 sur la Tyrosine 705, entraînant sa dimérisation ainsi que sa translocation nucléaire (Zhong et al., 1994). Stat3 peut également être phosphorylé sur la Serine 727, ce qui augmente sa capacité activatrice de transcription (Wen et al., 1995). Stat3 est nécessaire et suffisant pour garantir l'autorenouvellement des mESCs (Boeuf et al., 1997; Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 1998). Une des cibles principales de Stat3 est le gène Suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3) qui est un inhibiteur des protéines kinases JAK. En inhibant les JAKs, Socs3 crée une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie LIF/Stat3 (Schmitz, 2000).

b) JAK1 peut phosphoryler gp130 sur la Y759 entraînant le recrutement de SHP2. Cette dernière peut recruter les adaptateurs Grb2/Sos conduisant à l'activation de la voie des MAPK Ras/Raf/MEK/Erk1/2 (Schaper et al., 1998). La voie SHP2/Ras/MAPK n'est pas requise pour le maintien des mESCs en culture (Matsuda et al., 1999). Au contraire, son inhibition favorise leur autorenouvellement (Burdon et al., 1999).

c) SHP2 peut également activer Gab1, ce qui lui permet à son tour de se lier et d'activer la phosphatidylinositol-3-kinase (Pi3K) (Paling et al., 2004; Takahashi-Tezuka et al., 1998). La Pi3K est responsable de l'activation de la voie Pi3K/Akt/mTOR qui joue un rôle positif dans le



**Figure 11 : Voies de signalisation impliquées dans l'autorenouvellement des mESCs.**

En jaune, on retrouve le noyau de pluripotence ainsi que certains gènes composant le noyau de pluripotence étendu chez la souris. En violet, la voie LIF/Stat3 qui active de nombreux gènes qui soutiennent directement le noyau de pluripotence. En gris, on retrouve la voie des MAPK et de Pi3K activé notamment par le LIF. En bleu, la voie Wnt/βCat active directement et indirectement le noyau de pluripotence. En rouge, la voie BMP4/Smad 1/5/8 conduisant à l'activation des gènes *Ids* inhibant la différenciation en neurectoderme.

maintien de l'autorenouvellement des cellules ES de souris, notamment en activant Tbx3 et Tfe3 qui stimulent l'expression de Nanog et Esrrβ (Betschinger et al., 2013; Niwa et al., 2009a).

En absence de sérum, le LIF réduit mais n'empêche pas la différenciation des mESCs dans la voie du neurectoderme (Ying and Smith, 2003). La même équipe a également montré que l'ajout de BMP4 pouvait remplacer le FBS en prévenant la différenciation des mESCs (Ying et

al., 2003b). Les auteurs ont mis en évidence que la voie BMP4/Smad1,5,8 permet d'activer les gènes *Id* qui bloquent la différenciation en neur ectoderme (Figure 11). Les mESCs ont pu être cultivées dans un milieu basal (N2B27) en absence de FBS et de MEF, par l'ajout de LIF et BMP4. Le modèle suivant a été proposé : la voie LIF/Stat3 prévient la différenciation des cellules en mésoderme et endoderme (Bourillot et al., 2009) alors que la voie BMP4/Smad/Id bloque la différenciation en neur ectoderme (Ying et al., 2003b). Ces deux facteurs de croissance sont nécessaires et suffisants pour promouvoir l'autorenouvellement des cellules ES de souris.

La voie Wnt/ $\beta$ Cat permet également de soutenir la pluripotence des cellules ES murines (Figure 11). En effet, Sato *et al.* ont utilisé un inhibiteur chimique spécifique de la GSK3 $\beta$  nommé BIO (6-bromoindirubin-3-oxime) (Sato et al., 2004). Ils ont montré que cette inhibition mime l'activation de la voie Wnt canonique et permet au complexe  $\beta$ Cat/TCF d'activer les gènes de pluripotence *Oct4*, *Nanog* et *Rex1*. Ils affirment que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ Cat est suffisante pour maintenir les mESCs en autorenouvellement (Sato et al., 2004). Une étude plus récente confirme ces résultats en montrant que le complexe  $\beta$ Cat/Tcf1 active directement *Oct4* (Yi et al., 2011).

Tcf3 est le facteur de la famille Tcf/Lef le plus exprimé dans les mESCs (Pereira et al., 2006). Des travaux ont montré que Tcf3 favorisait la différenciation en réprimant directement l'expression de *Nanog* et *Esrrb* (Martello et al., 2012; Pereira et al., 2006). D'autres travaux ont mis en évidence que la  $\beta$ Cat inhibait l'action de Tcf3 lors de leur interaction (Wray et al., 2011). De plus, dans des mESCs l'ablation de Tcf3 (*Tcf3*<sup>-/-</sup>) mime l'activation de la voie Wnt par l'inhibition chimique de la GSK3 $\beta$  (Pereira et al., 2006; Yi et al., 2011). Au contraire l'absence de  $\beta$ Cat ( *$\beta$ Cat*<sup>-/-</sup>) annule l'effet positif de l'inhibition de la GSK3 $\beta$  sur l'autorenouvellement (Wray et al., 2011).

Ces résultats laissent penser que l'action principale de la voie Wnt passerait par l'inhibition de Tcf3 par la  $\beta$ Cat (Wray et al., 2011). Les auteurs concluent que la voie Wnt/ $\beta$ Cat n'est pas indispensable à la propagation des mESCs (mESCs  *$\beta$ Cat*<sup>-/-</sup>) mais qu'elle permet de stabiliser les mESCs. En résumé, la voie Wnt/ $\beta$ Cat semble jouer un rôle de soutien de l'autorenouvellement des mESCs en stabilisant le noyau de pluripotence par une voie parallèle au LIF qui implique notamment *Nanog* et *Esrrb*.

### 2.3.2. Les EpiSCs

Les Epiblast Stem Cells ou EpiSCs sont dérivées à partir de l'épiblaste d'un embryon au stade ovocylindre de souris. Elles ont été stabilisées en culture pour la première fois en 2007 par deux laboratoires (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Elles ont été dérivées à partir de l'épiblaste post-implantatoire à E5,5-6,5 chez différentes lignées de souris.

- Caractéristiques cardinales

Les EpiSCs se multiplient en formant des colonies de cellules serrées mais, contrairement aux mESCs, les colonies sont étendues et en monocouches plates. Elles ne supportent pas la dissociation enzymatique à la trypsine et requièrent un repiquage manuel pour leur expansion. Ceci est cohérent avec leur faible clonogénicité, où 1-4% de cellules uniques peuvent former une colonie (Tesar et al., 2007). Les EpiSCs sont pluripotentes et expriment Oct4, Sox2 et Nanog à un niveau comparable aux mESCs. Elles sont capables de se différencier dans les trois feuillets embryonnaires lors de la formation de EBs ou de tératomes (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007).

Les EpiSCs diffèrent des mESCs sur bien d'autres points. A l'inverse des mESCs et même de l'Epi, les EpiSCs ne présentent pas d'activité phosphatase alcaline. Les EpiSCs n'expriment pas certains marqueurs de l'ICM et des mESCs comme *Rex1* (*Zfp42*), *Dax1* (*Nr0b1*), *Pecam*, *Gbx2*, *Tbx3*. Elles présentent également un niveau d'expression de marqueurs de la lignée germinale plus faible que les mESCs. C'est le cas de *Blimp1* (*Pdrml*), *Stella* (*Dppa3*), *Piwili2*, *Stra8* et *Dazl*. En revanche les EpiSCs expriment davantage les marqueurs de l'Epi (FGF5 et Nodal) que les mESCs. C'est également le cas pour des marqueurs de différenciation précoce comme *Otx2*, *Eomes*, *Foxa2*, *brachyury* (*T*), *Gata6*, *Sox17* et *Cer1*.

De par leur profil d'expression, les EpiSCs sont différentes des mESCs et PGCs formées entre E6,5 et E7,5 dans l'épiblaste. Elles représentent un nouvel état de cellules souches pluripotentes, plus proche de l'Epi. Ceci a été confirmé par l'analyse du transcriptome en utilisant des microarrays (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Les EpiSCs sont plus proches entre elles que des mESCs. Elles ont également une signature moléculaire plus proche de l'Epi post implantatoire que de l'ICM. En accord avec ce profil moléculaire seul le PE du gène *Oct4* est actif, comme c'est le cas pour l'Epi post-implantatoire (Tesar et al., 2007).

Enfin la différence la plus marquante entre les EpiSCs et les cellules ES de souris concerne leur capacité à produire des chimères. Aucune chimère n'a été obtenue sur 49 embryons micro-injectés au stade blastocyste (Tesar *et al.*, 2007). De plus, lors de l'agrégation entre une morula et un amas d'EpiSCs, dans la majorité des cas on retrouve l'amas d'EpiSCs dans le blastocœle montrant leur incapacité à coloniser l'ICM. Ces observations sont cohérentes avec les résultats obtenus dans l'étude de Brons *et al.* où, par agrégation avec des embryons 8- ou 16-cellules, ils ont obtenu 2 chimères somatiques sur 385 embryons soit un taux de 0,5% (Brons *et al.*, 2007).

- **Maintien de l'autorenouvellement :**

Les EpiSCs ont pu être stabilisées dans différentes conditions : (i) sur fibronectine, dans un milieu chimiquement défini supplémenté avec du FGF2 et de l'Activine A (Brons *et al.*, 2007), (ii) sur MEF dans un milieu contenant un cocktail de facteurs sériques de remplacement (KO-SR) supplémenté avec du FGF2 (Tesar *et al.*, 2007).

Contrairement aux mESCs qui sont dépendantes de la voie de signalisation LIF/Stat3, les cellules EpiSCs sont dépendantes de la voie Activine A/Smad. Une inhibition pharmacologique spécifique de la voie LIF n'induit aucune modification du phénotype, alors qu'une inhibition de la voie Activine A induit la différenciation des EpiSCs (Brons *et al.*, 2007; Tesar *et al.*, 2007). Tesar *et al.* n'ajoutent pas d'Activine A dans le milieu de culture mais les cellules sont néanmoins dépendantes de l'Activine A qui est probablement sécrétée par les MEF. Enfin, le FGF2 semble stabiliser les cellules en culture mais n'est pas strictement nécessaire (Brons *et al.*, 2007).

## **2.4. L'homme**

Depuis l'obtention des mESCs en 1981, il a fallu attendre 17 ans avant que les premières cellules ES humaines (hESCs) soit dérivées (Thomson, 1998). Tous les embryons utilisés dans la recherche sont des embryons surnuméraires issus de fécondation *in vitro* (FIV) qui ne serviront pas à des fins médicales. C'est également dans ce cadre que Thomson a pu obtenir des embryons humains et dériver les cinq premières lignées de cellules ES humaines.



- **Caractéristiques cardinales:**

Les hESCs se multiplient en formant des colonies plates en monocouches comme les EpiSCs. Elles sont amplifiées par dissociation mécanique en amas et supportent mal la dissociation enzymatique à la trypsine. Elles possèdent une forte activité télomérase et phosphatase alcaline. Les hESCs sont stables génétiquement, en effet elles peuvent être cultivées au moins un an sans présenter d'anomalie chromosomique (Amit et al., 2000). Comme toutes les cellules pluripotentes, les hESCs sont capables de se différencier *in vitro* et *in vivo* en formant des EBs ainsi que des tératomes (Reubinoff et al., 2000; Thomson, 1998). Contrairement aux cellules pluripotentes murines, les hESCs n'expriment pas le marqueur de surface SSEA1 mais expriment SSEA3 et SSEA4 ainsi que TRA1-60 et TRA1-81 (Thomson, 1998). L'état d'inactivation du chromosome X dans les cellules hESCs est sujet à controverse et dépend souvent des lignées et des conditions de culture (Hall et al., 2008; Shen et al., 2008; Silva et al., 2008b). Cependant, une étude a montré que la dérivation en condition hypoxique (O<sub>2</sub> 5%), permettait d'obtenir des hESCs possédant deux chromosome X actifs (Lengner et al., 2010). Enfin, pour des problèmes éthiques évidents, la capacité de colonisation de ces cellules ne peut être testée.

- **Maintien de l'autorenouvellement :**

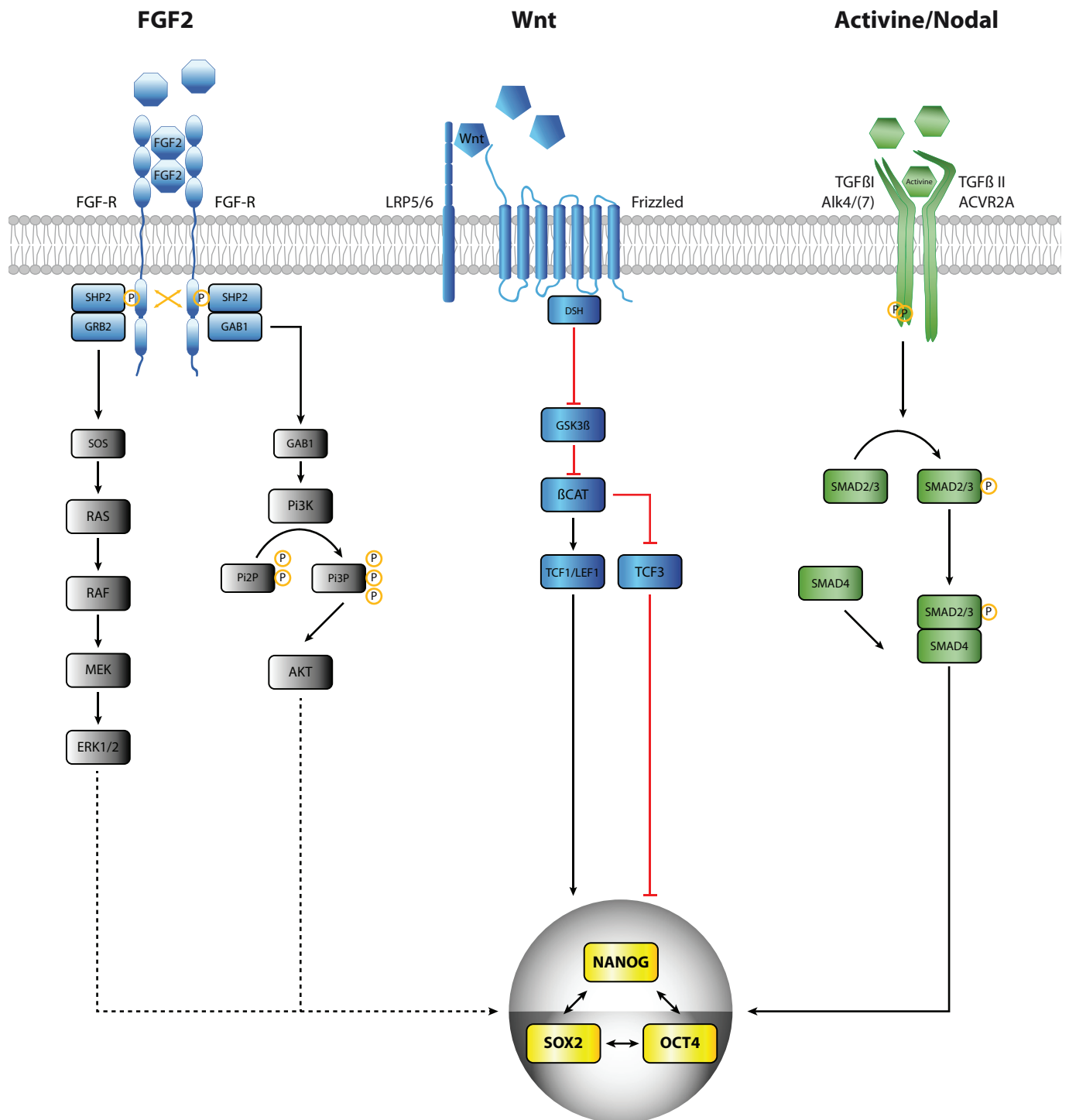
Les premières lignées de hESC (H1,H7,H9,H13,H14) ont été dérivées en présence de 20% de FBS sur MEF (Thomson, 1998). Très rapidement, le milieu de culture a été remplacé par le KO-DMEM + 20% de sérum de remplacement (KOSR) (Xu et al., 2001) et est encore utilisé aujourd'hui. En utilisant ces conditions de culture, les auteurs ont pu cultiver les hESCs sans cellules nourricières, sur matrigel ou laminine avec du milieu préalablement conditionné par des MEF (Xu et al., 2001). Ceci suggère que les MEF produisent des facteurs de croissance nécessaires à l'autorenouvellement des cellules ES humaines. Différentes équipes ont alors cherché à caractériser les facteurs de croissance soutenant la prolifération des hESCs.

Plusieurs équipes ont d'abord montré que l'autorenouvellement des hESCs n'était pas dépendants des voies de signalisation LIF/STAT3 et BMP4/Smad1,5,8. Le BMP4 induit la différenciation des hESCs en cellules du trophoctoderme (Gerami-Naini et al., 2004; Xu et al., 2002). A l'inverse, l'inhibition de la voie BMP4 bloque la différenciation des hESCs. Cela a été démontré en utilisant Noggin, son antagoniste (Xu et al., 2002) ainsi que la Dorsomorphine, un inhibiteur pharmacologique de BMP4 (Gonzalez et al., 2011). Pour la voie LIF, il avait déjà été observé qu'elle ne favorisait pas l'autorenouvellement des hESCs (Amit et al., 2000;

Thomson, 1998). De plus, Dahéron et al, ont montré que tous les acteurs de la voie LIF/STAT3 étaient conservés et exprimés dans les ESCs humaines (Dahéron et al., 2004). Dans les ESCs murines et humaines, une stimulation par le LIF humain induit la phosphorylation de STAT3 sur Y705 et S727, entraînant sa dimérisation ainsi que sa translocation nucléaire. Malgré la présence de dimères actifs de STAT3 dans le noyau, aucune réponse des hESCs au LIF n'a pu être mise en évidence.

La voie Wnt est impliquée dans la régulation de la pluripotence des hESCs (Figure 12). L'activation de la voie Wnt/ $\beta$ Cat mimée par l'inhibition pharmacologique de la kinase GSK3 $\beta$  semble être suffisante pour maintenir les hESCs en autorenouvellement (Sato et al., 2004). Cependant d'autres résultats indiquent que la voie Wnt/ $\beta$ Cat soutient l'autorenouvellement des hESCs mais n'est pas suffisante (Dravid et al., 2005). Les auteurs ont utilisé ici la protéine recombinante WNT3a et non l'inhibiteur pharmacologique ce qui peut expliquer la différence de conclusions entre les deux études. Une autre étude confirme que l'activation de la voie Wnt à elle seule n'est pas suffisante pour maintenir les cellules à un état indifférencié et nécessite l'activation des SMAD2/3 (James et al., 2005).

Les cellules nourricières, ou le milieu conditionné par ces cellules, peuvent être remplacées par l'ajout de FGF2 ou d'Activine A dans le milieu de culture (Beattie et al., 2005; Wang et al., 2005; Xu et al., 2005) (Figure 12). Le FGF2, aussi connu sous le nom de basic FGF (bFGF), joue un rôle dans le maintien de l'autorenouvellement des hESC (Wang et al., 2005; Xu et al., 2005). Le FGF2 a une action directe sur les cellules, passant par l'activation des voies MAPK et Pi3K (Kang et al., 2005; Li et al., 2007). De plus, le FGF2 pourrait avoir un rôle indirect. En effet, Greber *et al.* ont montré qu'en réponse au FGF2, les MEF et les hESCs sécrètent des TGF $\beta$  tel que l'activine et de l'insuline Growth Factor 2 (IGF2) (Greber et al., 2007a). Ces facteurs agissent de manière autocrine et paracrine pour soutenir la pluripotence des hESCs. Enfin, Vallier *et al.* ont mis en évidence que la voie Activine/SMAD2/3, soutenue par la voie FGF, était nécessaire et suffisante pour assurer l'autorenouvellement des hESCs (Vallier et al., 2005). De plus, en présence d'Activine A ou Nodal + FGF2, les hESCs peuvent être cultivées dans un milieu chimiquement défini, en absence de MEF, de milieu conditionné et de KOSR. L'ajout d'Activine A permet de compenser l'inhibition pharmacologique de la voie FGF alors que l'inverse n'est pas vrai. Ce résultat suggère que l'Activine représente la voie principale du maintien de l'autorenouvellement des hESCs. Les voies de signalisation représentent un point commun supplémentaire avec les EpiSCs de souris, qui sont également dépendantes de la voie Activine A soutenue par le FGF2.



**Figure 12 : Voies de signalisation impliquées dans l'autorenouvellement des hESCs.**

En bleu clair, la voie FGF conduisant à l'activation de multiples voies de signalisation dont les voies MAPK et Pi3K ici en gris. En bleu foncé, la voie Wnt/βCat soutenant le noyau de pluripotence. En vert, la voie des TGFβ (Activine/Nodal) conduisant à l'activation des Smad2/3.

## 2.5. Le lapin

L'obtention des cellules souches embryonnaires de lapin (RbESCs) a mis du temps avant d'être clairement établie. En effet, deux vagues de travaux existent dans l'histoire du lapin, correspondant à des publications datant des années 90 et des années 2000. Pour la première vague de travaux, Giles *et al.* ont cultivé l'ICM de lapin trois jours *in vitro*, avant de le réinjecter dans un embryon receveur, prouvant ainsi que les cellules conservent leur capacité à coloniser l'embryon et à former des chimères (Giles *et al.*, 1993). La même année, l'équipe de Moreadith fait mention de l'obtention de RbESCs putatives cultivables *in vitro* (Graves and Moreadith, 1993). Selon cette équipe, ces mêmes cellules ont la capacité de produire des chimères somatiques, suite à l'injection de 20 à 300 cellules dans un blastocyste receveur (Schoonjans *et al.*, 1996). Depuis, aucune autre étude n'a été publiée concernant ces cellules ou leur utilisation.

Il faut attendre la deuxième vague de travaux pour obtenir des RbESCs stables et caractérisées. Fang *et al.* publient l'obtention de RbESCs issues d'embryons fertilisés, parthénogénétiques, et issus d'un transfert nucléaire (Fang *et al.*, 2006). Ces cellules de type ESC forment des EBs et des tératomes mais n'expriment pas les marqueurs de surface SSEA1, SSEA3, SSEA4, Tra1-60 et Tra-1-81. Une autre équipe chinoise publie également l'obtention de RbESCs qui, cette fois, expriment tous les marqueurs classiques de pluripotence (Wang *et al.*, 2007). Enfin, un an plus tard, une équipe Japonaise publie, selon elle, "la première obtention de RbESCs stables" (Honda *et al.*, 2008). C'est en se basant sur le milieu de culture ainsi que sur les protocoles détaillés de cet article que nous avons obtenu les lignées de RbESCs dans notre laboratoire. Enfin, on peut noter que les auteurs de ces trois articles (Fang *et al.*, 2006; Honda *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007) remettent en question les précédents travaux de l'équipe de Moreadith.

- **Caractéristiques cardinales:**

Comme les ESCs de primates, les ESCs de lapin forment des colonies étendues, plates et en monocouches. Les RbESCs ont une forte activité phosphatase alcaline et expriment les gènes de pluripotence *Oct4*, *Sox2*, et *Nanog* (Honda *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007; Zakhartchenko *et al.*, 2011). L'expression des marqueurs de surface peut varier selon les études, mais on retrouve généralement SSEA1, Tra1-60, Tra1-81 (Honda *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007), SSEA3 (Wang *et al.*, 2007), SSEA4 (Honda *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007).

Généralement les RbESCs sont amplifiées par dissociation mécanique en amas et supportent mal la dissociation enzymatique à la trypsine. Enfin, comme toutes les cellules pluripotentes, les RbESCs sont capables de former des EBs et des tératomes.

Les RbESCs semblent incapables de coloniser l'embryon de lapin et produire des chimères (Honda et al., 2008). Un seul article fait mention de l'obtention d'une chimère ayant survécu 60 jours (Zakhartchenko et al., 2011). Les auteurs ont micro-injecté 198 embryons et obtenu une seule chimère, soit un taux de 0,5%. Compte tenu de cette faible efficacité et du fait que ce résultat n'a jamais été reproduit on peut conclure que, comme les EpiSCs, les RbESCs sont incapables de coloniser efficacement l'embryon de lapin.

- **Maintien de l'autorenouvellement :**

Généralement, les RbESCs sont cultivées sur cellules nourricières dans un milieu de culture contenant 20% de KOSR supplémenté avec du FGF2 (Honda et al., 2008). Concernant la dépendance au facteur de transcription des RbESCs, le rôle du LIF n'a pas clairement été établi. Bien que deux études aient montré que le LIF pouvait améliorer la dérivation (Intawicha et al., 2009), ou agir en soutien de la voie FGF2 (Hsieh et al., 2011), d'autres études ont montré que le LIF ne jouait aucun rôle dans le maintien de l'autorenouvellement des RbESCs (Honda et al., 2009; Wang et al., 2008). En revanche, la dépendance aux voies Activine/Smad et FGF2 fait consensus. En effet, une privation ou une inhibition pharmacologique de la voie FGF2 induit la différenciation des RbESCs (Honda et al., 2009; Hsieh et al., 2011; Wang et al., 2008). Le mécanisme d'action de la voie FGF ne semble pas impliquer la voie Pi3K/AKT. En effet, l'inhibition pharmacologique du récepteur au FGF2 n'induit pas la déphosphorylation de AKT (une cible de Pi3K). De même, l'inhibition directe de la Pi3K n'induit pas la différenciation (Honda et al., 2009). Concernant la voie Activine/Smad, son inhibition pharmacologique induit une diminution de la phosphorylation de Smad2 et Smad3, et conduit à la différenciation des RbESCs (Honda et al., 2009; Wang et al., 2008).

## 2.6. Les autres espèces

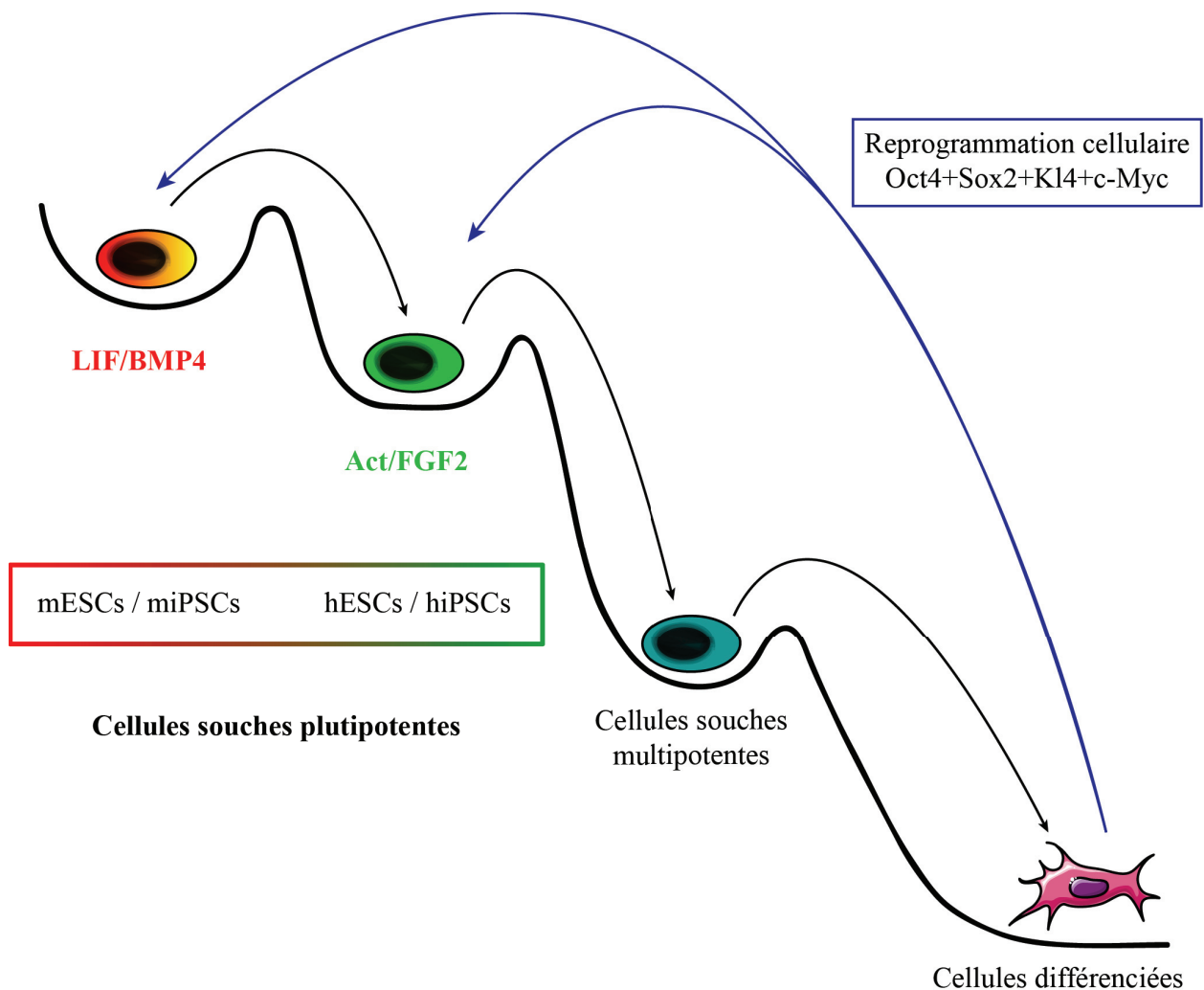
Depuis l'obtention des ESCs de souris, de nombreuses tentatives de dérivation de lignées de cellules ES ont été décrites chez différentes espèces : hamster (Doetschman et al., 1988b), porc (Piedrahita et al., 1990; Vackova et al., 2007), vison (Sukoyan et al., 1993), rat (Iannaccone et al., 1994), macaque rhésus (Thomson et al., 1995), marmoset (Thomson et al., 1996), mouton (Meinecke-Tillmann S *et al.* 1996), poulet (Pain et al., 1996), chèvre (Wells et al., 1997), macaque cynomolgus (Suemori et al., 2001), cheval (Saito et al., 2002) et chat (Yu et al., 2008). Généralement, les lignées obtenues ne sont pas stables en culture, à l'exception des ESCs de primates (incluant les cellules hESC). De plus, mises à part les ESCs de rat (dans certaines conditions) aucune lignée de mammifères n'a montré la capacité à former des chimères efficacement.

### 3. Les cellules souches pluripotentes induites

L'idée de la reprogrammation cellulaire est née de l'observation de la reprogrammation nucléaire. Suite aux travaux de transfert nucléaire d'une cellule somatique (SCNT) dans un ovocyte (Briggs and King, 1952; Wilmut et al., 1997) est née l'idée que le cytoplasme de ce dernier contenait des facteurs permettant de reprogrammer la chromatine de cellules somatiques jusqu'à atteindre la totipotence (Gurdon and Byrne, 2003). En 2006, Shinya Yamanaka et son équipe ont cherché à définir quels facteurs étaient nécessaires pour reprogrammer une cellule différenciée. Ils ont sélectionné 24 facteurs (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Stat3*, *βCat*, *c-Myc*, *E-Ras*, *Klf4*, *Dppa5*, *Dnmt3l*, *Utf1* etc...) connus pour jouer un rôle essentiel dans la régulation de la pluripotence et des modifications épigénétiques. En testant différents cocktails de facteurs, ils ont défini que la surexpression de Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc (OSKM) était suffisante pour reprogrammer des MEF en cellules souches pluripotentes appelées iPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006) (Figure 13).

#### 3.1. La souris

Les premières cellules iPS ont été obtenues chez la souris en surexprimant les facteurs de transcription Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc (OKSM) dans les MEF (Takahashi and Yamanaka, 2006). Pour surexprimer les transgènes, ils ont utilisé des vecteurs rétroviraux (pMX) dérivés du Virus de la Leucémie Murine de Moloney (MoMuLV). Dans ce type de vecteurs, l'expression des transgènes est sous contrôle du promoteur viral situé dans la Long Terminal Repeat (LTR). La LTR permet un niveau de transcription élevé dans les cellules somatiques alors qu'elle est réprimée par des modificateurs de la chromatine exprimés spécifiquement dans les cellules pluripotentes. De ce fait, les transgènes sont exprimés au cours de la reprogrammation et naturellement réprimés lorsque l'état de pluripotence est atteint. Ainsi les iPSCs complètement reprogrammées sont indépendantes de l'expression des transgènes et leur autorenouvellement est garanti par la réactivation des gènes de pluripotence endogènes. Ceci représente le critère essentiel permettant d'affirmer que les iPSCs sont complètement reprogrammées.



**Figure 13 : La reprogrammation cellulaire.**

Schéma représentant différents niveaux de différenciation, des cellules pluripotentes en haut, aux cellules en différenciation terminale en bas. Les bassins représentent des états stabilisés occupés par différents types de cellules souches. Les flèches bleues indiquent la reprogrammation cellulaire induite par la surexpression de Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc jusqu'aux bassins de pluripotence.

Les iPSCs de souris (miPSCs) sont l'équivalent des mESCs, qui représentent le "gold standard" des cellules souches pluripotentes. Les iPSCs possèdent toutes les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des cellules souches pluripotentes. Elles présentent une forte activité phosphatase alcaline, l'expression des marqueurs de surface spécifiques des mESCs, une forte activité télomérase, la réactivation du deuxième chromosome X pour les lignées femelles, la capacité à produire des EBs et des tératomes. Enfin, elles peuvent produire des chimères somatiques (Takahashi and Yamanaka, 2006) et germinales (Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007).



Lors de la première obtention de miPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006), les auteurs ont utilisé un système de sélection  $\beta$ geo sous contrôle du promoteur Fbxo15. Les miPSCs ainsi obtenues n'étaient pas capables de générer des chimères germinales et avaient un profil de méthylation de l'ADN différent des mESCs. En revanche, en utilisant un système de sélection sous contrôle du promoteur d'*Oct4* ou de *Nanog*, les iPSCs obtenues ont un profil épigénétique comparable aux mESCs et ont la capacité de générer des chimères germinales (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). Ceci montre que différents niveaux de reprogrammation peuvent être obtenus et que seules les iPSCs complètement reprogrammées peuvent être équivalentes des ESCs.

Les iPSCs correctement sélectionnées ont un statut épigénétique comparable au mESCs. L'analyse globale de la méthylation de l'ADN et des histones montre que les miPSCs sont identiques aux mESCs (Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). En effet, on retrouve 94% de régions méthylées communes aux deux types de cellules. C'est également le cas pour la présence des marques d'histones bivalentes (H3K4me3 + H3K27me3) spécifiques des cellules ES (Maherali et al., 2007). Avec ces travaux, les auteurs ont conclu que l'homologie entre ESC et iPSC était du même ordre que celle existant entre lignées de cellules ES.

D'autres études plus récentes font état d'une variabilité moléculaire et fonctionnelle entre lignées ainsi que d'une mémoire épigénétique des iPSCs (Kim et al., 2010; Miura et al., 2009; Polo et al., 2010). En effet, il semble que certaines marques épigénétiques spécifiques du lignage de la cellule d'origine soient conservées. La présence de ces marques favorise la différenciation des cellules dans le tissu d'origine, limitant ainsi l'efficacité de différenciation dans les autres lignages. Ce phénomène n'est pas observé lors de la reprogrammation par SCNT (Kim et al., 2010), ce qui suggère une limitation de la technique de reprogrammation par facteurs de transcription.

## 3.2. L'Homme

Après leur découverte chez la souris, les premières iPSCs humaines (hiPSCs) ont été obtenues très rapidement par trois laboratoires (Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Seul le laboratoire de Thomson a utilisé un cocktail de reprogrammation différent, à savoir Oct4, Sox2, Nanog et Lin28 (Yu et al., 2007). Les hiPSCs sont cultivées dans les mêmes conditions que les hESCs et sont dépendantes des mêmes voies de signalisation (Activine A et FGF2). De même que pour la souris, les hiPSCs ont les mêmes caractéristiques et capacités que les hESCs. Elles expriment les mêmes marqueurs de surface (SSEA3/4 ; Tra1-60/81) et ont une forte activité phosphatase alcaline (Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Les hiPSCs ont également la capacité de former des EBs et des tératomes. On peut tout de même noter que le processus de reprogrammation chez l'homme (3-4 semaines) est deux fois plus lent que chez la souris (1-2 semaines). De plus, l'efficacité est également réduite (de l'ordre de 0,001%) (Maherali et al., 2008).

Concernant la proximité des hiPSCs avec les hESCs, des résultats contradictoires ont été publiés. Une étude portant sur 12 lignées de hiPSCs et de hESCs a révélé que la répartition des modifications d'histones H3K4me3 et H3K27me3 était similaire entre cellules ES et iPS (Guenther et al., 2010). En effet, en comparant les lignées d'ESCs ou d'iPSCs entre elles, ou en comparant les ESCs aux iPSCs, on retrouve la même proportion de sites différentiellement modifiés : environ 1,5% pour H3K4me3 et 6% pour H3K27me3. En analysant le transcriptome de différentes lignées déjà publiées (Chin et al., 2009; Maherali et al., 2008; Marchetto et al., 2009), les auteurs ont montré que les différences observées étaient plus grandes entre laboratoires qu'entre lignées, et donc sûrement dues à des biais techniques et des conditions de culture différentes (Guenther et al., 2010). Ils concluent, à l'inverse des précédentes études, que les différences observées ne permettent pas de différencier une lignée d'iPSCs d'une lignée d'hESCs. En revanche, une analyse de la méthylation de l'ADN, montre des différences entre iPSCs et ESCs (Lister et al., 2011). Les travaux de Lister *et al.* ont mis en évidence l'existence de grandes variations entre lignées d'hiPSCs, soulignant la variabilité du mécanisme de reprogrammation, ainsi qu'une mémoire épigénétique liée au tissu d'origine des cellules somatiques utilisées. En plus des méthylations différentielles des îlots CpGs, ils ont montré des anomalies de méthylation de régions proches des télomères et des centromères, attestant d'une reprogrammation incomplète (Lister et al., 2011). Ces observations sont en accord avec les résultats précédemment publiés par d'autres équipes (Deng et al., 2009; Doi et al., 2009).

Enfin, dans une étude récente, l'équipe de Shoukhrat Mitalipov a comparé la reprogrammation nucléaire et la reprogrammation cellulaire (Ma et al., 2014). Ils ont ainsi comparé des ESCs issues d'embryons après transfert nucléaire (NT-ES) et des hiPSCs issues des mêmes cellules somatiques, avec des ESCs issues d'embryons fécondés *in vitro* (IVF-ES). Ils ont montré que les NT-ES étaient plus proches des IVF-ES que ne le sont les iPSCs. En effet, après analyse du transcriptome, du profil de méthylation de l'ADN, et de la méthylation des gènes soumis à empreinte, un clustering hiérarchisé a montré que les NT-ES étaient systématiquement plus proches des IVF-ES que des iPSCs (Ma et al., 2014).

Comme pour la souris (Kim et al., 2010), les auteurs font état d'une mémoire épigénétique dans les hiPSCs. Ils concluent que, contrairement à la reprogrammation nucléaire, la reprogrammation cellulaire est souvent incomplète et ne permet pas l'effacement complet des marques épigénétiques issues des cellules somatiques d'origine (Ma et al., 2014).

### 3.3. Le lapin

L'équipe de Arata Honda a été la première à produire des iPSCs chez le lapin (RbPSC) (Honda et al., 2010). La reprogrammation a été effectuée grâce à la surexpression des transgènes OSKM humains introduits à l'aide de vecteurs viraux intégratifs dans des cellules hépatiques et des cellules de l'estomac (Honda et al., 2010). Les RbPSCs présentent toutes les caractéristiques des cellules pluripotentes et une extinction complète des transgènes. Elles présentent une forte expression de Oct4 et Nanog endogènes, expriment les marqueurs de surface SSEA1/4 (Honda et al., 2010). Elles ont une forte activité phosphatase alcaline, ainsi que la capacité de former des EBs et des tératomes (Honda et al., 2010). Les RbPSCs sont cultivées dans le même milieu que les RbESCs (DMEMF12+20%KOSR+FGF2). Par ailleurs, les cellules sont passées en routine par dissociation enzymatique à la trypsine.

### 3.4. Les autres espèces

Des lignées d'iPSCs ont pu être obtenues chez plusieurs espèces : le macaque rhésus (Liu et al., 2008), le rat (Liao et al., 2009), le porc (Ezashi et al., 2009; Wu et al., 2009), le porc miniature du Tibet (Esteban et al., 2009), le marmoset (Tomioka et al., 2010), le chien (Shimada et al., 2010), le mouton (Li et al., 2011b), le cheval (Nagy et al., 2011), ainsi que chez des espèces en voie d'extinction comme le singe *Mandrillus leucophaeus* et le rhinocéros blanc (Ben-nun et al., 2011). Comme le démontrent ces différentes études, le même cocktail de

transgènes est efficace et permet d'obtenir des iPSCs chez de très nombreuses espèces. Cela représente un intérêt non négligeable de la technologie de reprogrammation permettant d'obtenir des PSCs à partir d'espèces pour lesquelles l'obtention d'embryons est limitée ou compliquée, comme pour les gros animaux d'élevage ou certains animaux sauvages (Ben-nun et al., 2011).

### **3.5. Les différentes techniques et approches de reprogrammation cellulaire**

Depuis l'obtention des premières iPSCs par l'équipe de Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006), de nombreuses stratégies d'obtention d'iPSCs ont été mises au point et seront donc présentées brièvement.

#### **3.5.1. Les différents cocktails de gènes utilisés**

Très rapidement après l'obtention des premières iPSCs différentes combinaisons de gènes ont été testées. Chez la souris et chez l'homme, on a montré que c-Myc n'était pas indispensable mais améliorait l'efficacité de reprogrammation (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008). En effet, en absence de c-Myc, le taux de reprogrammation diminue d'un facteur 10 à 100 et la durée du processus de reprogrammation est doublée (4-5 semaines chez la souris) (Wernig et al., 2008). Cependant, le pourcentage de souris chimériques développant des tumeurs passe de 15% à 0% avec des cellules iPS obtenues sans c-Myc, ceci étant cohérent avec le caractère potentiel oncogénique de ce facteur.

Chez la souris, Nakagawa *et al* ont remplacé chaque facteur par un autre gène appartenant à la même famille (Nakagawa et al., 2008). Ils ont ainsi montré que Oct4 ne pouvait être remplacé ni par Oct1, ni par Oct6. Quant à Sox2, il peut être remplacé par Sox1 et Sox3, avec toutefois une efficacité réduite. En revanche, l'utilisation de Sox7/15/17/18 ne permet pas l'obtention de lignées d'iPS. Klf4 peut être remplacé par Klf2 avec la même efficacité et par Klf5 avec une diminution de 50%. Ceci est cohérent avec le rôle redondant des Klf dans le maintien de la pluripotence (Jiang et al., 2008). Il en va de même pour c-Myc qui a pu être remplacé par L-Myc et N-Myc sans modification significative de l'efficacité de reprogrammation (Nakagawa et al., 2008). Une autre équipe a montré que Esrr $\beta$  active Klf4 et de ce fait peut le remplacer dans le cocktail de reprogrammation même en l'absence de c-Myc (Oct4, Sox2, Esrrb) (Feng et al., 2009). Enfin, le récepteur nucléaire Nr5a2 peut remplacer Oct4 en présence ou non de c-Myc (Heng et al., 2010).

Plus récemment, certains articles ont rapporté que certains clusters de micro-ARNs permettaient d'aider la reprogrammation induite par les TcFs OSKM. Ainsi, les clusters miR302s (miR 302a/b/c/d/miR367) aident la reprogrammation en facilitant la transition épithelio-mésenchymateuse (Hu et al., 2013; Liao et al., 2011; Lin et al., 2011). D'autres publications montrent que la surexpression de miRNA est suffisante pour permettre la reprogrammation de cellules somatiques chez l'homme et la souris. La surexpression du cluster miR302s seul (Anokye-Danso et al., 2011; Lin et al., 2011), ou en association avec le miR200c et le cluster mi369s (Miyoshi et al., 2011) permet d'obtenir des iPSCs.

De manière générale, l'utilisation du cocktail de Yamanaka (OSKM) est prédominante et permet d'atteindre une efficacité de reprogrammation maximale. En revanche, l'utilisation d'autres types cellulaires que les fibroblastes embryonnaires semble améliorer l'efficacité et la cinétique de reprogrammation.

### **3.5.2. Les différents types cellulaires utilisés**

Des iPSCs ont pu être obtenues à partir de quasiment tous les types cellulaires : fibroblastes de peau adulte (souris) (Nakagawa et al., 2008) (lapin) (Osteil et al., 2013), hépatocytes (souris) (Aoi et al., 2008) (lapin) (Honda et al., 2010), cellules épithéliales de l'estomac (souris) (Aoi et al., 2008) (lapin) (Honda et al., 2010), cellules pancréatiques bêta (souris) (Stadtfeld et al., 2008a), cellules souches et progéniteurs neuraux (souris) (Eminli et al., 2008; Kim et al., 2008; Silva et al., 2008a) (homme) (Kim et al., 2008, 2009b), cellules du cordon ombilical (homme) (Cai et al., 2010), cellules de la membrane amniotique (homme) (Cai et al., 2010), lymphocyte B (souris) (Hanna et al., 2008), kératinocytes (homme) (Aasen et al., 2008; Maherali et al., 2008), cellules sanguines (souris) (Eminli et al., 2009) (homme) (Loh et al., 2009), mélanocytes (souris, homme) (Utikal et al., 2009), cellules folliculaires capillaires (homme) (Lin et al., 2011), cellules stromales adipocytaires (souris) (Miyoshi et al., 2011). Enfin, pour l'anecdote, différentes équipes ont obtenu des iPSCs à partir de cellules endothéliales présentes dans l'urine (Xue et al., 2013; Zhou et al., 2011) et de cellules stromales issues de sang menstruel (Li et al., 2013). Les auteurs avancent que l'utilisation de telles cellules permet d'obtenir très facilement du matériel biologique de nombreux patients, dans le but de générer des banques d'iPSCs (Xue et al., 2013).

Outre une démonstration de faisabilité, la reprogrammation d'autres types cellulaires a également apporté des informations supplémentaires. Par exemple, la reprogrammation de cellules pancréatiques productrices d'insuline (Stadtfeld et al., 2008a) et surtout de

lymphocytes T ou B (Eminli et al., 2009; Hanna et al., 2008) ont apporté la preuve formelle que les iPSCs sont bien issues de cellules complètement différenciées et non de cellules souches adultes naturellement présentes en très faible proportion dans les tissus somatiques. En effet, lors de la maturation terminale des lymphocytes, il y a des recombinaisons de l'ADN au niveau des gènes codants pour les chaînes légères et lourdes d'immunoglobuline. Ainsi, en se servant de ces recombinaisons comme marqueurs, les auteurs ont démontré que les iPSCs étaient bien issues de cellules complètement différenciées (Eminli et al., 2009; Hanna et al., 2008).

La dérivation de différents types cellulaires a également permis de mettre en évidence qu'ils ne présentaient pas tous la même efficacité de reprogrammation. En effet, la reprogrammation de kératinocytes est jusqu'à 100 fois plus efficace et deux fois plus rapide (Aasen et al., 2008; Maherali et al., 2008). On a également montré que le niveau de différenciation des cellules influait sur la reprogrammation. Les progéniteurs hématopoïétiques ont une efficacité de reprogrammation pouvant atteindre 10-20%, soit jusqu'à 300 fois supérieure aux cellules sanguines en différenciation terminale comme les lymphocytes B et T (Eminli et al., 2009).

Enfin plusieurs équipes ont montré que les cellules souches neurales (NSCs) se reprogrammaient plus rapidement et plus efficacement que les fibroblastes (Eminli et al., 2008; Kim et al., 2008; Silva et al., 2008a). On peut noter que les NSCs expriment *Sox2* à un niveau comparable à celui des ESCs et *Klf4* et *c-Myc* à un niveau élevé. C'est pourquoi, en utilisant les NSCs, des iPSCs ont pu être obtenues : (i) en absence de surexpression de *Sox2* (*Oct4*+*Klf4*+*c-Myc*) (Eminli et al., 2008) ; (ii) en surexprimant uniquement deux facteurs : *Oct4* et *Klf4* et *Oct4* et *c-Myc* (Kim et al., 2008) ; (iii) en surexprimant seulement *Oct4* chez la souris (Kim et al., 2009b) et chez l'homme (Kim et al., 2009c). Il est important de noter que l'efficacité et la cinétique de reprogrammation sont affectées par l'absence des transgènes. Ainsi, en utilisant seulement *Oct4*, la première colonie est apparue après 4 à 5 semaines chez la souris (contre 4 jours avec OSKM) et après 11 semaines chez l'homme.

La reprogrammation de cellules souches sanguines (Eminli et al., 2009) et de cellules souches neurales (Kim et al., 2009b, 2009c) est plus rapide et plus efficace que celle de cellules complètement différenciées (Eminli et al., 2009). Cela amène l'idée, plutôt intuitive, que la proximité avec les cellules PSCs faciliterait la reprogrammation notamment par un état épigénétique plus permissif. De manière triviale, on peut dire "qu'il y a moins de chemin à parcourir".

### 3.5.1. Les différents types de vecteurs utilisés

Depuis l'utilisation des vecteurs rétroviraux (pMX), de très nombreuses stratégies de surexpression des transgènes ont été utilisées. D'autres méthodes intégratives ont été utilisées, comme les vecteurs lentiviraux inductibles dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Brambrink et al., 2008a; Hockemeyer et al., 2008). Afin d'éviter la réactivation des transgènes, certains ont utilisé des vecteurs excisables avec le système Cre/Lox (Soldner et al., 2009; Sommer et al., 2009) ou transposons de type Piggy Bac excisables avec la recombinase pBase (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009). Lors de la transduction avec quatre vecteurs rétroviraux indépendants, on retrouve 20 insertions provirales en moyenne par cellule, augmentant considérablement le risque de mutagenèse insertionnelle. Une alternative proposée est d'utiliser un vecteur polycistronique contenant les quatre transgènes séparés par des séquences 2A permettant l'auto-clivage du polypeptide (Carey et al., 2009; Sommer et al., 2009).

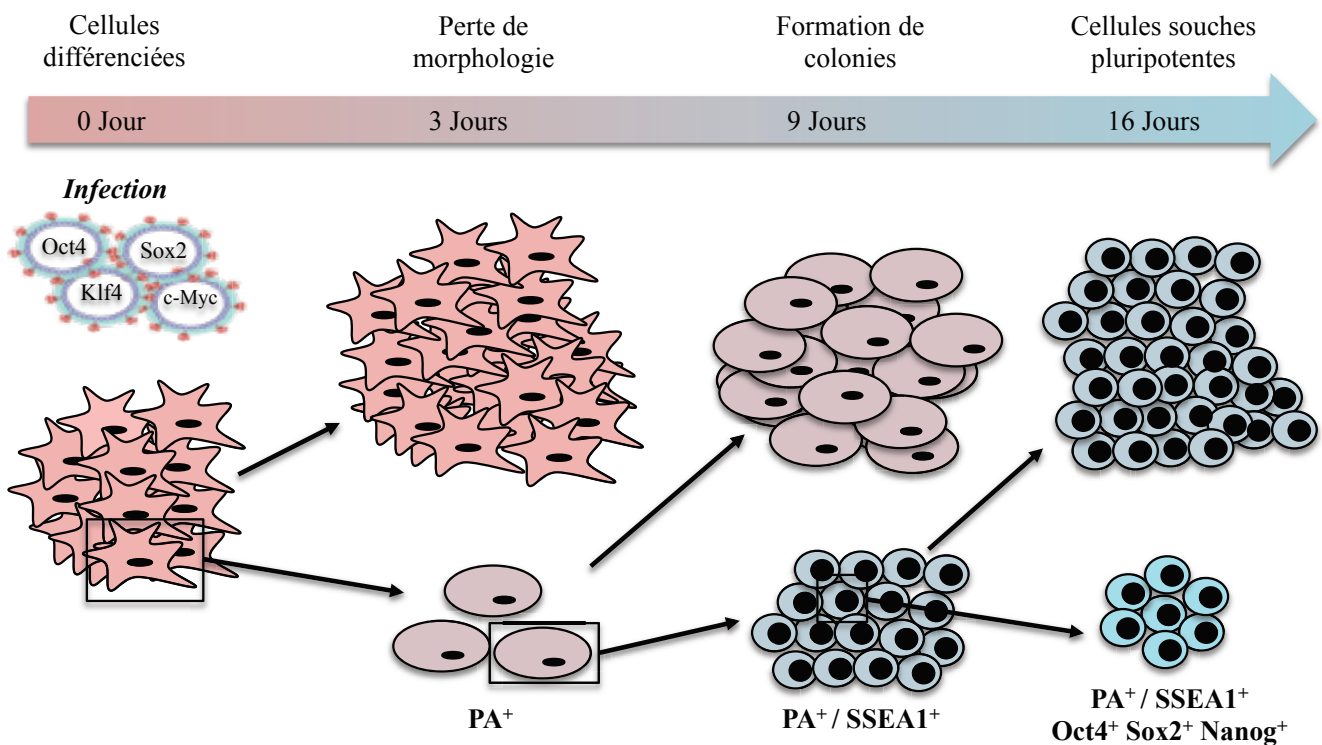
Afin d'éviter toute mutation induite par l'insertion des transgènes, des méthodes non intégratives ont également été développées. Ainsi des iPSCs ont pu être fabriquées par transfection répétée de plasmides (Okita et al., 2008), par infection de vecteurs adénoviraux (Stadtfield et al., 2008b), par transfection de vecteurs épisomaux (Yu et al., 2009), par transfection de vecteur minicercle non viral (Jia et al., 2010), par transduction directe de protéines recombinantes (Kim et al., 2009a; Zhou et al., 2009), par transfection répétée d'ARNm modifiés (Plews et al., 2010; Warren et al., 2010, 2012), et par l'utilisation de Sendai virus, des vecteurs viraux réplicatifs à ARN appartenant à la famille des paramyxovirus (Ban et al., 2011; Fusaki et al., 2009; Macarthur et al., 2012). Il est important de noter que la majorité des méthodes non intégratives ont un rendement inférieur à l'utilisation de rétrovirus. Cependant, bien que couteuse et contraignante, la méthode de transfection répétée d'ARNm modifiés est au moins aussi efficace que l'utilisation de rétrovirus. Parmi les méthodes plus récentes, les Sendai virus représentent une alternative non intégrative relativement efficace.

Certaines de ces méthodes ont permis d'étudier et de mieux comprendre le mécanisme de reprogrammation. Par exemple, l'utilisation de vecteurs polycistroniques permet l'expression de tous les transgènes à un niveau comparable, alors que l'utilisation de quatre vecteurs indépendants permet d'obtenir différents niveaux d'expression de chaque transgène dans les cellules (Carey et al., 2009; Sommer et al., 2009). L'utilisation de vecteurs polycistroniques présente une efficacité de reprogrammation grandement réduite, ce qui semble indiquer qu'il existe une fenêtre d'expression de chaque transgène pour permettre la reprogrammation.



En utilisant un système inductible pour synchroniser le début de la reprogrammation, deux équipes ont pu décrire les grandes étapes de la reprogrammation chez la souris (Brambrink et al., 2008b; Stadtfeld et al., 2008c) (Figure 14) :

- Trois jours après le début de l'induction, on observe une diminution des gènes de lignages, les cellules changent de morphologie, et certaines acquièrent une activité phosphatase alcaline.
- Entre le 6<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jours, les premières colonies apparaissent, et les cellules commencent à exprimer des marqueurs de mESCs comme SSEA1.
- Entre le 12<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> jours, on observe dans certaines cellules une réactivation progressive des gènes endogènes de pluripotence ainsi que de marqueurs clefs de la pluripotence, comme l'activation du deuxième chromosome X et l'expression de la télomérase.



**Figure 14 : Evènements majeurs de la reprogrammation.**

La chronologie des événements a été observée au cours de la reprogrammation de cellules chez la souris. PA : Phosphatase Alcaline.



### 3.5.2. L'ajout de petites molécules

De nombreuses petites molécules ont été utilisées pour améliorer l'efficacité de reprogrammation ou réduire le nombre de transgènes. Ainsi, on peut les diviser en trois groupes : (i) les petites molécules en remplacement d'un gène, (ii) les inhibiteurs d'enzymes de remodelage de la chromatine, (iii) les petites molécules qui interagissent avec les voies de signalisation.

Dans le but d'identifier des petites molécules capables de remplacer un des facteurs, des criblages de petites molécules ont été réalisés en l'absence de ce dernier. Par exemple, RepSox (comme son nom l'indique) permet de remplacer Sox2 lors de la reprogrammation (Ichida et al., 2009). Les auteurs ont montré que RepSox inhibait la voie TGF $\beta$ II et permettait la stimulation de Nanog chez la souris. La kenpaullone a également été utilisée en remplaçant le Klf4 (Lyssiotis et al., 2009). La kenpaullone est un inhibiteur de kinases à effet pléiotrope. Elle inhibe notamment la GSK3 $\beta$  et certains complexes cycline/Cdk. Cependant, les auteurs montrent que l'inhibition de la GSK3 $\beta$  par le CHIR99021 (un inhibiteur très spécifique) ne permet pas de remplacer Klf4 et concluent que le mode d'action de la Kenpaullone passe par une fonction encore mal caractérisée.

Dans le deuxième groupe, on retrouve BIX-01294, un inhibiteur de l'histone méthyl-transférase G9a, qui a permis d'obtenir des cellules iPS à partir de NSCs (Neural Stem Cells) en l'absence du gène *Oct4* (Shi et al., 2008). La 5'aza-cytidine (5-AZA) est un inhibiteur de DNA methyl-transferase et qui améliore l'efficacité de reprogrammation (Huangfu et al., 2008a; Mikkelsen et al., 2008). De plus, ces travaux ont montré que l'ajout tardif de 5-AZA (8 jours post-infection) permettait de reprogrammer complètement 80% des clones iPSCs partiellement reprogrammés (Mikkelsen et al., 2008). Dans une autre étude, Huangfu et al ont comparé l'efficacité de reprogrammation en présence de différentes petites molécules. Ils ont montré que différents inhibiteurs d'histones déacétylases (suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), trichostatin A (TSA) et le Vaploic Acid (VPA)) permettaient d'augmenter aussi bien l'efficacité que la cinétique de reprogrammation (Huangfu et al., 2008a). On peut noter le VPA qui a montré le plus grand effet, avec une amélioration d'un facteur 100X (Huangfu et al., 2008a), et a permis de reprogrammer des fibroblastes humains en utilisant seulement Oct4 et Sox2 (Huangfu et al., 2008b). Le recours à ces inhibiteurs laisse penser que l'ouverture de la chromatine est primordiale dans le mécanisme de reprogrammation.

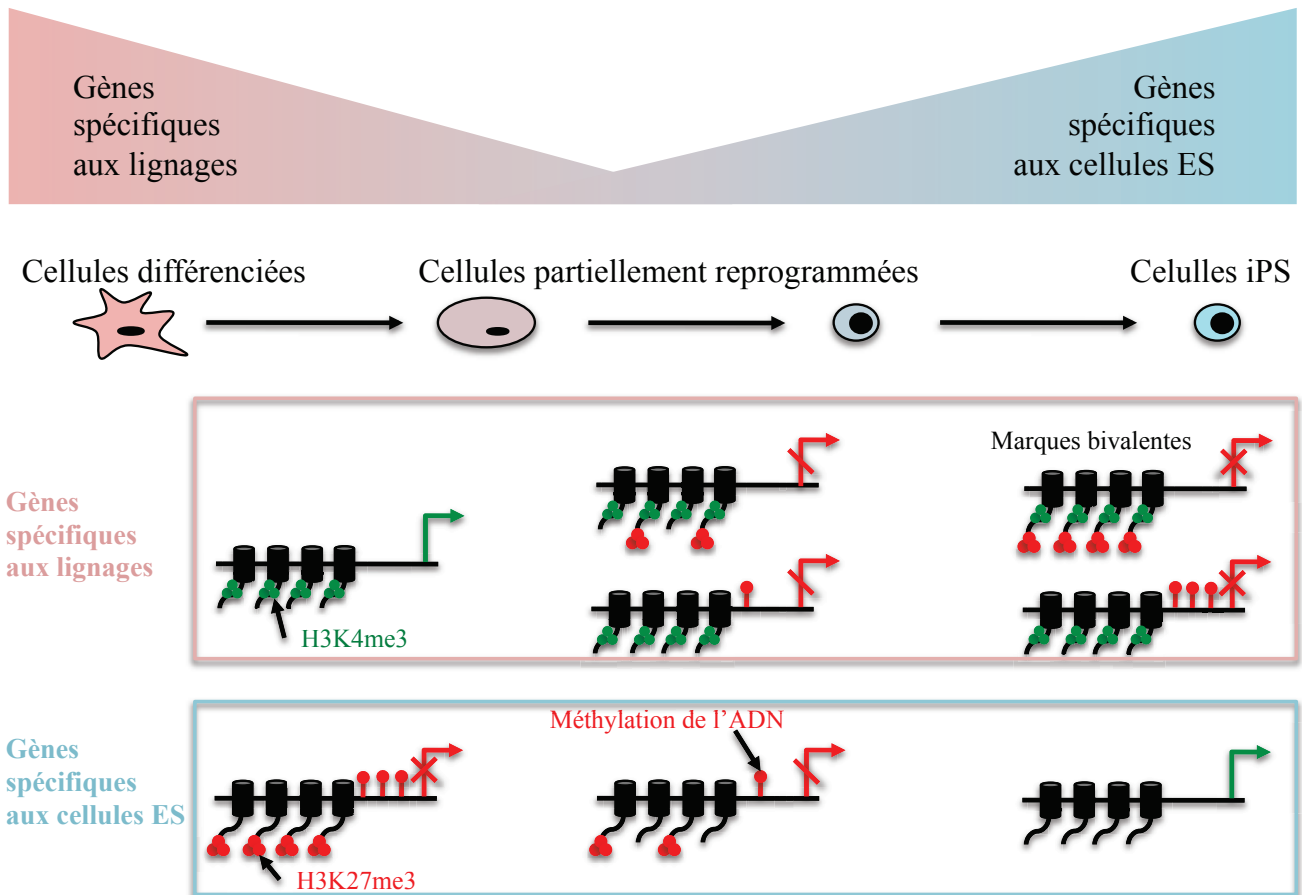
Le troisième groupe agit sur les voies de signalisation. On retrouve Wnt3a qui permet d'activer la voie Wnt/ $\beta$ Cat et semble améliorer la reprogrammation (Marson et al., 2008a). Comme nous l'avons vu précédemment, la voie Wnt est impliquée dans le maintien de la pluripotence de ESCs humaines et murines (Dravid et al., 2005; Sato et al., 2004). L'équipe d'Austin Smith a également montré que la culture en milieu 2i/LIF (CHIR99021 GSK3 $\beta$ i + PD0325901 MEKi) permettait d'achever la reprogrammation des clones d'iPSCs partiellement reprogrammés (Silva et al., 2008a).

En résumé, une partie des petites molécules soutient la pluripotence et ce, en activant directement les gènes de pluripotence, ou en agissant sur les voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'autorenouvellement des PSCs. L'autre partie conduit à l'ouverture de la chromatine, facilitant l'accès des facteurs de transcription à leurs cibles.

### **3.5.3. Hypothèse du mécanisme général de reprogrammation**

Le mécanisme de reprogrammation peut être résumé en deux grands principes (Figure 15). Le premier consiste en un remodelage général de la chromatine avec une remise à zéro de l'épigénome, et le second correspond à la réactivation du noyau de pluripotence endogène. Le premier effet de l'expression des transgènes de reprogrammation est l'extinction des gènes de lignage. Cette répression peut se faire par action directe des facteurs de transcription Oct4 et Sox2, connus pour réprimer les gènes de différenciation. Ces transgènes peuvent également activer d'autres acteurs, facteurs de transcription ou enzymes de régulation de la chromatine, réprimant à leur tour les gènes spécifiques au lignage. En parallèle, l'expression des transgènes induit l'activation de gènes spécifiques des cellules pluripotentes. Cette activation nécessite, elle aussi, un remodelage de la chromatine, avec cette fois une décondensation et une perte des marques répressives au niveau des gènes de pluripotence. Les cellules perdent alors leur morphologie de cellules différenciées et forment des colonies similaires à celles des cellules ES. A ce stade, les cellules ne sont pas encore reprogrammées et sont toujours dépendantes de l'expression des transgènes pour maintenir cet état intermédiaire entre la différenciation et la pluripotence. Les produits des transgènes ont accès progressivement aux loci nécessaires au maintien de l'autorenouvellement et de la pluripotence, grâce au remaniement continu de la chromatine. Différents gènes et voies de signalisation spécifiques des cellules ES sont alors activés, comme le gène de la télomérase. Durant les dernières phases de la reprogrammation, les transgènes réactivent le noyau de pluripotence endogène. La réactivation totale de *Nanog*,

*Sox2* et *Oct4* endogènes conduit au rétablissement complet des marques bivalentes. Les cellules deviennent indépendantes de l'expression des transgènes et ont réactivé tous les circuits nécessaires au maintien de l'autorenouveau et de la pluripotence. Elles possèdent alors toutes les caractéristiques des cellules ES et sont de véritables cellules iPS.



**Figure 15 : Mécanismes épigénétiques de la reprogrammation.**

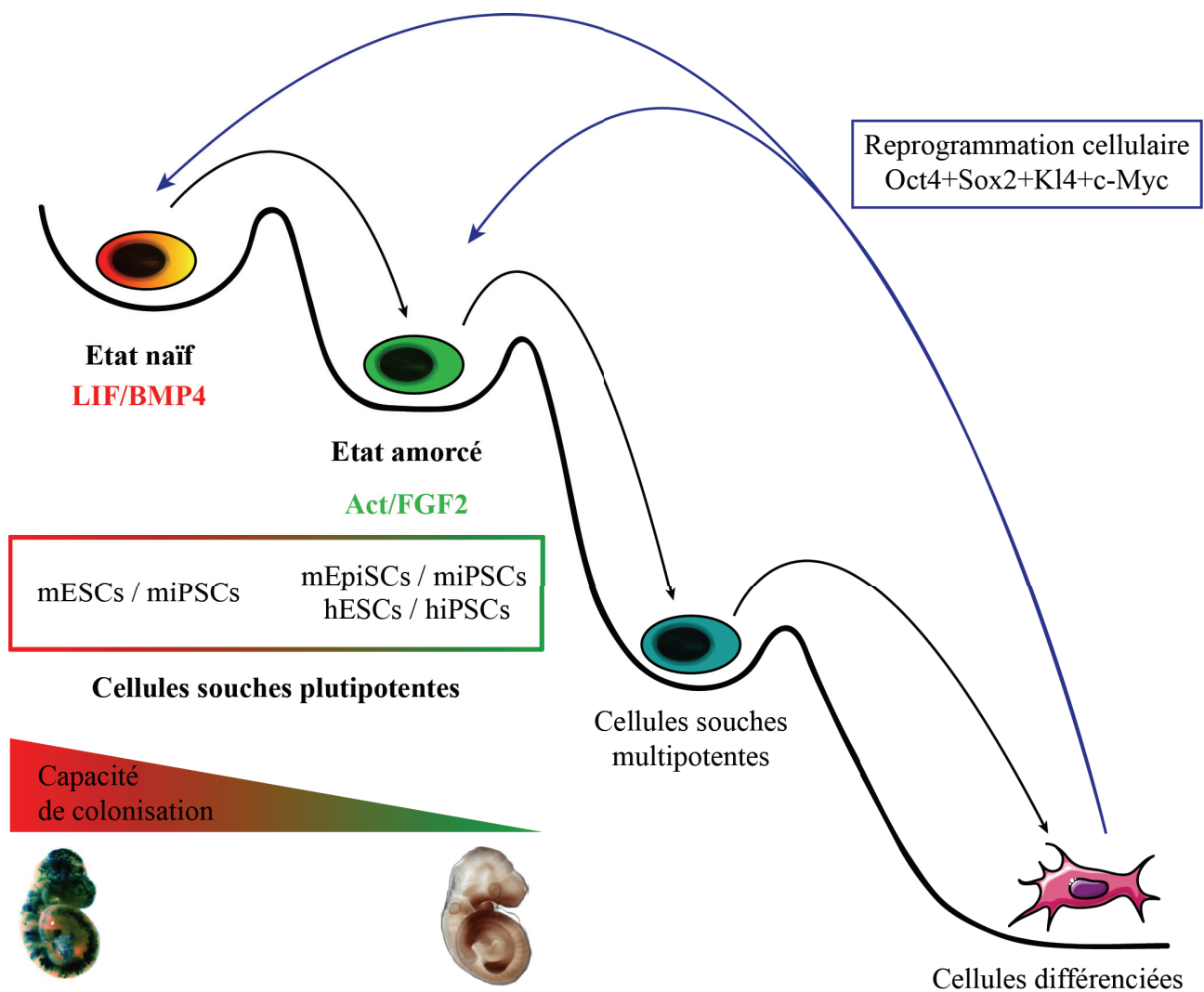
Les cellules différenciées passent par des stades intermédiaires durant lesquels se produisent un remodelage de la chromatine et une évolution de l'expression des gènes. Les gènes de lignages, transcrits dans les cellules différenciées, sont progressivement réprimés par méthylation de l'ADN et mise en place de la marque bivalente d'histone activatrice (H3K4me3) et inhibitrice (H3K27me3). A l'inverse, les gènes spécifiques des PSCs sont réactivés par perte des méthylations de l'ADN et élimination de la marque répressive H3K27me3.

## 4. Les différents états de pluripotence

Pendant longtemps, la pluripotence a été caractérisée et définie par les mESCs qui représentent le "gold standard" des cellules souches pluripotentes. Cependant, l'obtention plus récente des EpiSCs a permis de définir un deuxième état de pluripotence, différant tant au niveau moléculaire que fonctionnel. On parle aujourd'hui d'état naïf, représenté par les mESCs, et d'état amorcé, caractérisé par les EpiSCs (Figure 16). L'étude des caractéristiques liées à ces deux états a très vite permis de classer les cellules ES des autres espèces dans la catégorie des cellules amorcées, notamment par leur dépendance aux voies FGF/Activine ainsi que par leur incapacité à produire des chimères. En outre, depuis l'obtention des EpiSCs, d'autres états ont également été décrits, comme l'état fondamental de pluripotence et l'état 2C. De nombreuses études ont défini des ponts entre ces différents états permettant de convertir ou "réverter" les cellules d'un état à l'autre. Nous allons tout d'abord définir dans ce chapitre les différents états de pluripotence puis nous verrons dans le chapitre suivant les travaux traitant du passage d'un état pluripotence à l'autre. Un tableau récapitulant les caractéristiques principales de chaque état de pluripotence sera présenté en fin de chaque sous-partie.

### 4.1. L'état fondamental et l'état naïf de pluripotence

L'état fondamental est défini par Austin Smith comme l'état dans lequel les cellules sont "indépendantes de toute spécification développementale ou de restriction épigénétique et ont la capacité de s'autorenouveler de manière complètement autonome." L'état fondamental existerait naturellement dans le développement embryonnaire des mammifères et serait représenté par les cellules de l'épiblaste précoce, mais il peut également être stabilisé en culture dans certaines conditions. L'état naïf est défini comme un état métastable où les cellules peuvent fluctuer spontanément entre l'état fondamental et l'état d'engagement.



**Figure 16 : Les différents niveaux de pluripotence.**

Les cellules de souris cultivées en présence de LIF/BMP4 (mESCs/miPSCs) s'autorenouvellent à l'état naïf de pluripotence. Les cellules cultivées en présence de FGF/Activine s'autorenouvellent à l'état amorcé de pluripotence. On retrouve dans cette catégorie les hPSCs mais également les EpiSCs et les iPSCs de souris reprogrammées en présence de FGF/Activine. La différence majeure entre ces deux états est leur capacité de colonisation où seules les cellules à l'état naïf colonisent l'embryon.

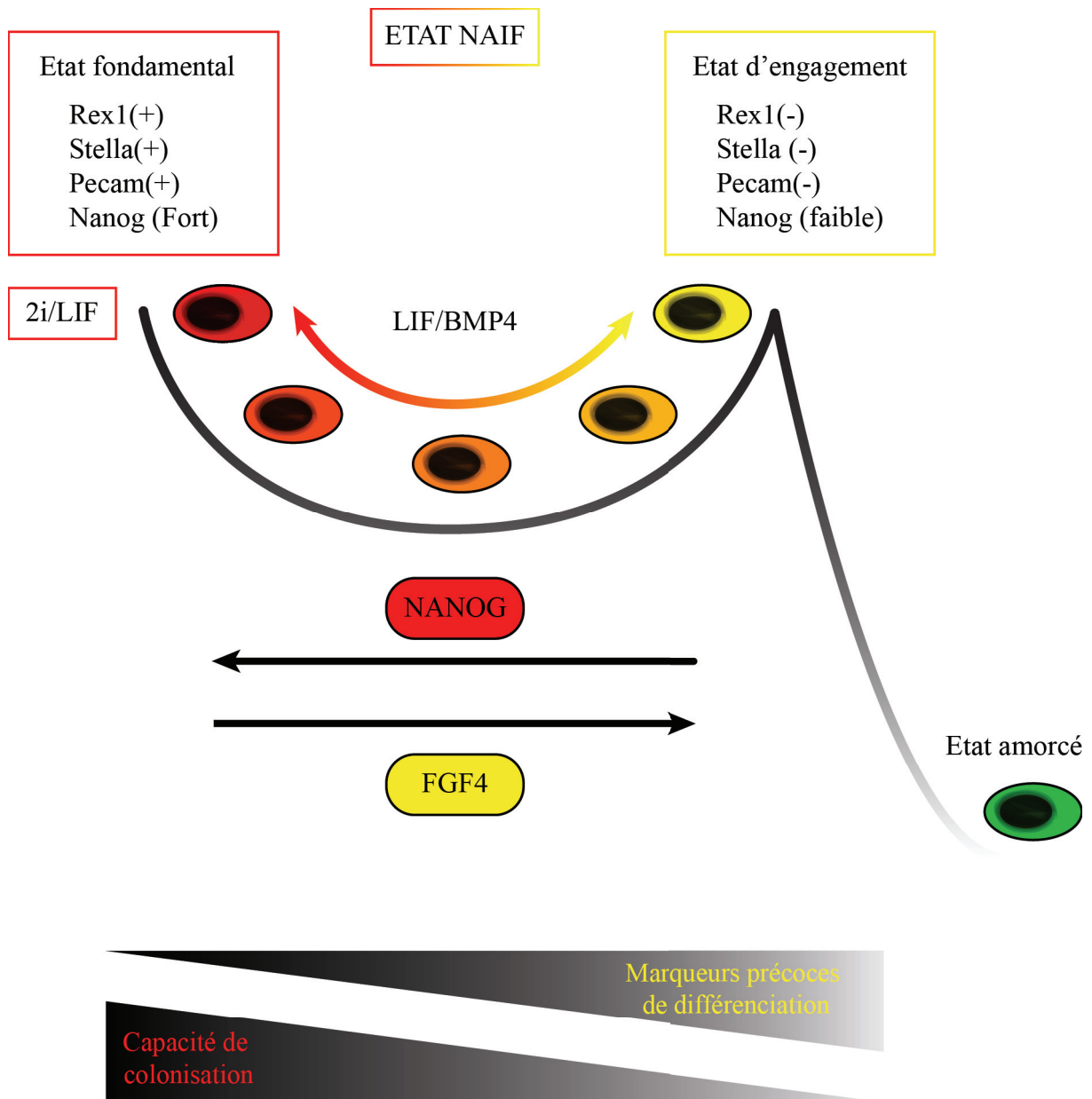
### 4.1.1. L'état de pluripotence naïf, un état métastable

L'état naïf de pluripotence est celui des mESCs s'autorenouvellant dans les conditions standards de culture (FBS/ BMP4 + LIF). Bien que la culture de mESCs semble homogène, une analyse plus poussée a mis en évidence une hétérogénéité cellulaire. En effet, il existe différentes sous populations de cellules caractérisées par l'expression de marqueurs comme Rex1 (Zfp42) (Toyooka et al., 2008), Stella (Dppa3) (Hayashi et al., 2008), Pecam1 (Furusawa et al., 2004), Zscan4 (Zalzman et al., 2010) et Nanog (Chambers et al., 2007; Singh et al., 2007). Dans toutes ces études, les auteurs ont montré que les sous-populations positives et négatives pour ces marqueurs présentaient des différences aux niveaux moléculaire et fonctionnel. En revanche, l'état de ces sous populations n'est pas stable et définitif. Au contraire, les cellules fluctuent spontanément d'un état à l'autre. C'est pourquoi on parle d'état naïf métastable (Figure 17).

- *Rex1*: les cellules Oct4+/Rex1+ expriment les facteurs de transcription de la pluripotence naïve à des niveaux 5 à 10 fois plus élevés que les cellules Oct4+/Rex1-. Au contraire, les cellules Oct4+/Rex1- expriment certains marqueurs de différenciation précoce comme FGF5, Sox17 et T (Brachyury) (Toyooka et al., 2008). De plus, seules les cellules Rex1+ ont la capacité de former des embryons chimères. Selon les auteurs, les cellules Rex1+ se trouvent à l'état de pluripotence fondamentale, alors que les cellules Rex1- sont plus proches de l'engagement vers la différenciation.

- *Stella*: le profil de méthylation ainsi que la capacité de différenciation des cellules Stella+ et Stella- sont différents (Hayashi et al., 2008). Les cellules Stella- portent moins de marques épigénétiques activatrices (H3K9Ac, H3K4me3) sur les gènes de pluripotence. De plus, la sous-population Stella- se différencie plus facilement et plus rapidement *in vitro* que les cellules Stella+. Elle pourrait donc être plus sensible aux signaux de différenciation.

- *Pecam1*: des différences fonctionnelles ont été observées entre les cellules Pecam+ et Pecam1-. Les cellules Pecam1+ colonisent plus efficacement l'embryon que les cellules Pecam1- (Furusawa et al., 2004).



**Figure 17 : L'état naïf métastable**

Schéma représentant le bassin de pluripotence naïve où les mESCs fluctuent entre l'état fondamental et l'état d'engagement. Ces deux états sont caractérisés par l'expression différentielle de certains marqueurs de pluripotence ainsi que par leur capacité à coloniser l'embryon.

- *Zscan4* : Dans une population de mESCs, seules 5% des cellules expriment le gène *Zscan4*. Grâce à une étude de traçage de lignage avec un système "rapporteur floxé" et la recombinaison Cre placée sous contrôle transcriptionnel de *Zscan4*, les auteurs ont observé que toutes les cellules fluctuent entre les deux états *Zscan4*<sup>+</sup> et *Zscan4*<sup>-</sup>. La fréquence de leur passage par le stade *Zscan4*<sup>+</sup> est évaluée à 20 jours (Zalzman et al., 2010). Les cellules *Zscan4*<sup>+</sup> ont aussi une élongation des télomères plus rapide. On peut noter que les mESCs ayant activé *Zscan4* présentent une capacité accrue à produire des chimères après injection dans le blastocyste (Amano et al., 2013). Selon les auteurs, les cellules se trouveraient dans un état de pluripotence fondamentale après l'activation de *Zscan4*.

- *Nanog* : L'expression de *Nanog* fluctue au cours du temps formant deux sous-populations de mESCs, *Nanog*<sup>élevé</sup> et *Nanog*<sup>faible</sup> (Chambers et al., 2007; Singh et al., 2007). Comme dans l'embryon précoce, les mESCs *Nanog*<sup>faible</sup> expriment plus fortement des marqueurs du PrE comme *Gata6* (Singh et al., 2007) et ont une sensibilité accrue aux signaux de différenciation en comparaison aux cellules *Nanog*<sup>élevé</sup> (Chambers et al., 2007; Singh et al., 2007). De plus, lors d'une privation de LIF, la population *Nanog*<sup>faible</sup> se différencie préférentiellement en PrE, ce qui peut s'expliquer par le fait que *Nanog* réprime directement l'expression de *Gata6* (Singh et al., 2007). On peut conclure que le niveau d'expression de *Nanog* influence la stabilité des mESCs, et que les mESCs ayant une expression de *Nanog* élevé se trouveraient donc dans un état de pluripotence fondamentale.

De manière générale, les cellules négatives pour les marqueurs décrits ci-dessus ont une expression des gènes de pluripotence plus faible et elles expriment déjà des marqueurs de différenciation précoce (Figure 17). C'est ce que l'on appelle l'état d'engagement, qui est réversible spontanément. Les cellules positives pour ces marqueurs sont moins sensibles aux signaux extracellulaires et sont donc plus proches de l'état fondamental de pluripotence. Dans les conditions de culture standard, les cellules ES de souris oscillent naturellement entre ces différentes sous-populations. C'est ce que l'on définit comme l'état naïf métastable.



### 4.1.2. Stabilisation de l'état fondamental de pluripotence

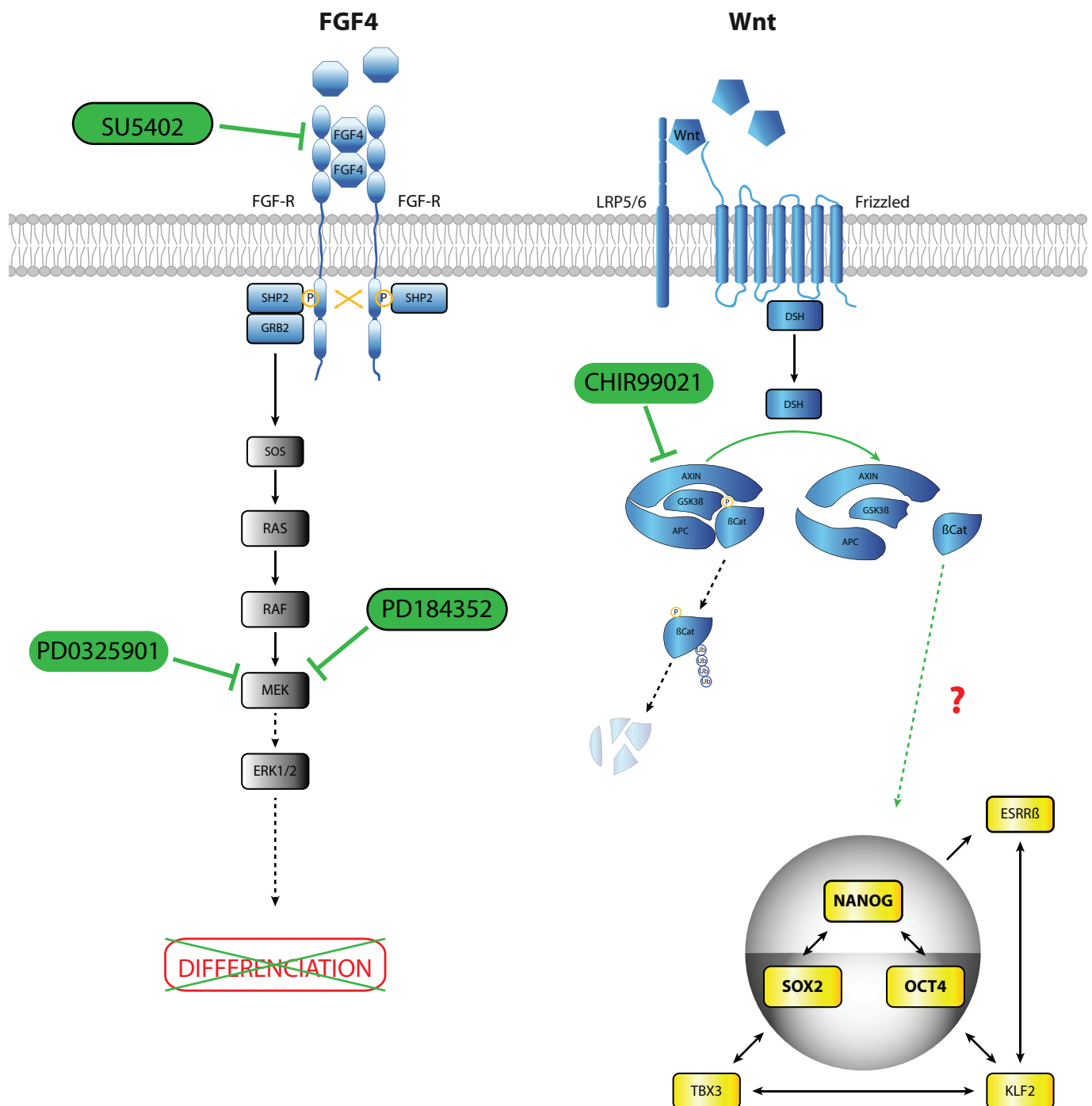
Les mESCs sécrètent le facteur FGF4 de manière autocrine (Ma et al., 1992) mais il n'est pas requis pour le maintien en autorenouvellement (Burdon et al., 1999). Au contraire, l'inhibition pharmacologique du récepteur au FGF4, ou l'inactivation du gène *Fgf4* (mESCs *Fgf4*<sup>-/-</sup>), rend les mESCs moins sensibles aux signaux de différenciation (Kunath et al., 2007). De la même manière, les mESCs *Erk2*<sup>-/-</sup> sont réfractaires à la différenciation *in vitro* en neurectoderme et mésoderme (Kunath et al., 2007). Les auteurs concluent que la voie FGF4/Erk1/2 permet d'induire le passage des mESCs à l'état d'engagement, état nécessaire dans l'embryon pour initier les programmes de différenciation permettant le développement (Kunath et al., 2007; Stavridis et al., 2007). A l'inverse, l'inhibition de la voie FGF/Erk permet le maintien des mESCs dans un état proche de l'état fondamental de pluripotence. Ainsi, la fluctuation des mESCs entre l'état fondamental et l'état d'engagement serait en partie contrôlée par la voie FGF4/MAPK.

L'équipe d'Austin Smith a décrit des conditions de culture permettant de stabiliser les mESCs à l'état fondamental de pluripotence, appelées milieu 2i ou 3i (Ying et al., 2008). Ils utilisent le milieu chimiquement défini (sans sérum) N2B27 (Ying and Smith, 2003; Ying et al., 2003a) supplémenté d'inhibiteurs chimiques spécifiques (Figure 18) :

- 3i = FGFRi (SU5402) + MEKi (PD184352) + GSK3βi (CHIR99021)

- 2i = MEKi (PD0325901) + GSK3βi (CHIR99021) β

Dans cette étude, ils montrent que les mESCs peuvent être cultivées en présence de PD+SU seulement, mais que l'ajout de CHIR permettrait d'assurer la survie cellulaire et de stimuler la prolifération. Les cellules cultivées en milieu 2i/3i possèdent toutes les caractéristiques de cellules naïves et sont capables de produire des chimères germinales. Les cellules sont maintenues en culture sans cellules nourricières, sans sérum et sans LIF. De plus, ces travaux révèlent que les cellules *Stat3*<sup>-/-</sup> peuvent être cultivées dans ces conditions (Ying et al., 2008). Ceci semble montrer que les cellules sont indépendantes de tous signaux extérieurs et qu'elles possèdent un programme d'autorenouvellement autonome. Ils concluent que, dans le milieu 2i/3i, les cellules s'autorenouvellent à l'état fondamental de pluripotence. Dans de nombreuses études ultérieures, les auteurs utilisent le milieu 2i supplémenté avec le LIF (2i/LIF), car bien que le LIF ne soit pas nécessaire, il semble améliorer la prolifération des cellules en culture (Ying et al., 2008).



**Figure 18 : Le milieu 2i/3i**

Schéma représentant le mode d'action des 2i/3i sur les voies FGF/MAPK et Wnt/ $\beta$ Cat dans les mESCs.  
 2i : PD0325901 + CHIR99021. 3i : PD184352 + SU5402 + CHIR99021.

### 4.1.3. Origine embryonnaire des cellules ESCs

Les lignées de mESCs sont fabriquées à partir de l'ICM du blastocyste, mais ceci ne veut pas dire qu'elles en sont la copie conforme. Les mESCs ont dû s'adapter pour se maintenir en autorenouvellement en culture *in vitro*. Nous avons fait un lien entre mESCs, ECs, et des PGCs d'une part, l'ICM et l'Epi d'autre part (Voir chapitre 1.2). Une étude plus approfondie du développement embryonnaire et des mESCs nous permet aujourd'hui de détailler ce propos.

- Origine et établissement de l'état naïf de pluripotence

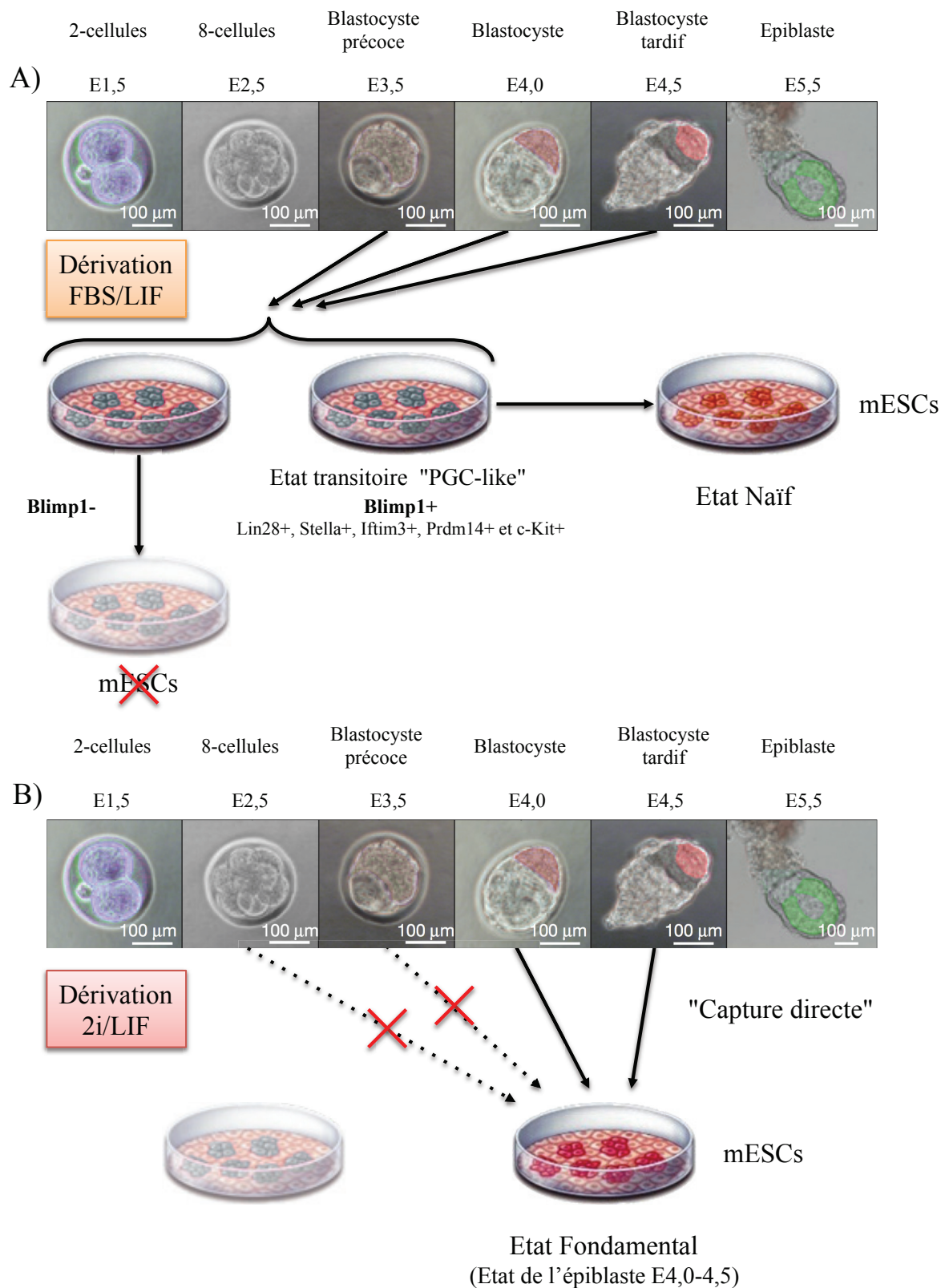
Une étude réalisée en 1997 avait montré que l'efficacité de dérivation de lignées de mESCs était fortement augmentée si on utilisait l'épiblaste du blastocyste péri-implantatoire (E4.5) au lieu de l'ICM du blastocyste à E3.5 (Brook and Gardner, 1997). L'efficacité observée avec l'épiblaste E4.5 peut atteindre près de 100%. On peut penser que l'épiblaste de l'embryon E4.5 est le véritable tissu fondateur des cellules mESCs. Nous verrons plus loin que l'analyse de signature moléculaire des cellules soutient cette hypothèse. On a également montré que seul un petit nombre de cellules participe à l'établissement d'une lignée (Buehr et al., 2003). La majorité des cellules perdent l'expression de Oct4 après quelques jours en culture. Cette observation soulève la question suivante : est ce que cette minorité de cellules suit un programme particulier lui permettant de se maintenir en culture ?

Pour répondre à cette question, Tang et collaborateurs ont analysé le transcriptome des cellules de l'ICM (E3,5), de l'épiblaste (E4,5) à l'échelle unicellulaire par la technique de "single-cell RNA seq", puis l'ont comparé à celui de mESC en culture (Tang et al., 2010). Ils ont montré que, durant la dérivation en milieu FBS/LIF, des changements importants s'opéraient et que les cellules suivaient un programme commun. Les gènes *Ifitm3*, *Blimp1*, *Prdm14*, et *Vasa*, dont l'expression est associée à l'engagement précoce dans le lignage germinale, étaient fortement activés durant les premières phases de la dérivation. Ils proposent que les cellules de l'ICM passent par un état transitoire ressemblant à celui des PGCs avant de se stabiliser en cellules mESC *in vitro* (Tang et al., 2010) (Figure 19A). Chu et collaborateurs ont approfondi cette question en étudiant les mécanismes moléculaires mis en place lors de l'établissement des lignées de cellules ES en culture (Chu et al., 2011). Ils se sont intéressés à l'expression du facteur de transcription *Blimp1* (*Prdm1*) qui est essentiel à la formation des PGCs lors du développement embryonnaire (Vincent et al., 2005). Ils ont utilisé un système

"rapporteur", composé de la recombinaise Cre sous contrôle du promoteur Blimp1 et d'une protéine fluorescente RFP-stop-"floxée" sous contrôle du promoteur Rosa26. L'expression de la RFP permet de détecter l'activité transitoire du gène Blimp1 dans les cellules. En utilisant ce système d'expression ils ont observé que, parmi les cellules participant à l'établissement des lignées de mESCs, 80% avaient activé Blimp1. De plus, une analyse à l'échelle unicellulaire de l'expression génique a révélé que l'expression de Blimp1 était associée à d'autres marqueurs spécifiques des PGCs comme Lin28, Stella, Ifim3, Prdm14 et c-Kit ([Chu et al., 2011](#)). Ces résultats indiquent que la majorité des cellules de l'ICM passeraient par un état transitoire "PGCs-like" avant de devenir des cellules mESC.

Une fois les lignées établies, on sait qu'à l'état naïf, les cellules fluctuent entre l'état fondamental et l'état d'engagement. Y a-t-il une relation entre les différentes sous-populations des cellules et les différents états de développement de l'épiblaste dans l'embryon ? Nous savons que, sur la base de leur profil d'expression génique et de modifications épigénétiques, les cellules positives pour l'expression de Rex1 ou Stella sont plus proches de l'ICM/épiblaste précoce (E3,5-4,5), alors que les cellules négatives pour l'expression de ces deux gènes sont plus proches de l'épiblaste précoce/tardif (E4,5-5,5) ([Hayashi et al., 2008](#); [Toyooka et al., 2008](#)). Ces observations conduisent à l'idée que, dans l'état naïf, les différentes sous-populations de cellules correspondraient à différents stades du développement embryonnaire.

En résumé, les cellules de l'épiblaste précoce seraient à l'origine des mESCs dont la stabilisation en culture passe par un état transitoire PGCs-like. Une fois en culture, les cellules fluctuent entre différents états plus ou moins avancés, proches des stades de l'épiblaste préimplantatoire.



**Figure 19 : Origine embryonnaire des mESCs.**

(A) Dérivation de lignées de mESCs en conditions FBS/LIF, à partir d'embryons au stade blastocyste (E3,5/E4,5). La majorité des cellules participant à l'établissement des lignées passent par un état transitoire "PGC-like" où elles activent des marqueurs spécifiques des PGCs. (B) Dérivation en conditions 2i/LIF où seul l'épiblaste tardif de blastocystes préimplantatoire (E4-4,5) permet l'obtention de lignées de mESCs. Le milieu 2i/LIF permet une "capture directe" de l'état de l'épiblaste. Les photographies d'embryons sont adaptées de (boroviak *et al.*, 2014)

- Origine et établissement de l'état fondamental de pluripotence

Nous avons vu précédemment que les milieux de culture 2i et 3i sont capables de stabiliser les mESCs à l'état naïf dans un état de pluripotence appelé état fondamental. Nous avons aussi vu que l'établissement des lignées passe par un état dit "PGC-like" caractérisé par l'expression transitoire de *Blimp1* (Chu et al., 2011). En utilisant le milieu 2i/3i, les mêmes auteurs ont montré que les cellules qui n'ont jamais activé *Blimp1* peuvent produire des lignées de cellules mESC avec une efficacité 20 fois supérieure qu'en conditions standard (FBS/LIF). Ces observations peuvent être interprétées de la manière suivante : le milieu 2i/3i permet de contourner la transition Epi → mESC par l'état "PGC-like" et autorise une capture directe de l'état fondamental de pluripotence qui caractérise l'épiblaste précoce.

L'idée selon laquelle le milieu 2i/3i capture un état fondamental de pluripotence qui pré-existe dans l'épiblaste est renforcée par l'étude de l'embryon de souris en culture. Lorsque des morula/blastocystes sont cultivés dans le milieu 2i/3i, la formation du PrE est bloquée et toutes les cellules de l'ICM forment l'épiblaste (Nichols et al., 2009a). Un autre argument tient à la nature mono- ou bi-allélique de l'expression du gène *Nanog*. *Nanog* possède une expression mono-allélique durant les premières étapes du développement pré-implantatoire. Son expression devient progressivement bi-allélique dans les cellules de l'ICM et de l'épiblaste précoce représentant l'état fondamental de pluripotence (Miyazari and Torres-Padilla, 2012). L'expression de *Nanog* redevient mono-allélique dans l'épiblaste tardif (post-implantatoire). Or, on a observé que l'expression de *Nanog* est bi-allélique en milieu 2i/LIF et mono-allélique en milieu FBS/LIF (Miyazari and Torres-Padilla, 2012). Ces données renforcent l'idée que le milieu 2i permet une capture de l'état fondamental de pluripotence qui est l'état de pluripotence de l'épiblaste précoce in vivo.

Tous les arguments apportés jusqu'à maintenant pour soutenir l'origine embryonnaire de l'état fondamental de pluripotence sont des arguments indirects. Une étude très récente a tenté de répondre plus directement à la question de l'origine embryonnaire des mESCs dans l'état fondamental de pluripotence (Boroviak et al., 2014). Pour cela, les auteurs ont dérivé des lignées de mESCs à partir de cellules uniques de l'ICM d'embryons à différents stades de développement (E2,25-E2,5 / E3,25-E3,5 / E3,75-E4,0 / E4,25-E4,5) (Boroviak et al., 2014). En cultivant les cellules dans le milieu 2i/LIF, ils ont observé une meilleure efficacité de dérivation à partir des embryons entre E3,75 et E4,5, ce qui coïncide avec le stade de la formation de l'épiblaste (Figure 19B). De plus, en utilisant un substrat proche de la matrice extracellulaire du

blastocyste (Fibronectine + Laminine 511), ils ont observé que quasiment toutes les cellules de l'épiblaste avaient la capacité de produire une lignée de mESC (Boroviak et al., 2014).

L'analyse par "single-cell qPCR" de l'expression de 96 marqueurs de pluripotence dans les cellules de l'embryon et dans les lignées cultivées en 2i/LIF a confirmé que la signature moléculaire des mESCs était plus proche de celle des cellules de l'épiblaste (E4,5) que de celle des cellules de l'ICM. De plus, cette signature moléculaire est stable au cours du processus de dérivation des lignées. L'ensemble de ces résultats démontre que le milieu 2i/LIF permet la capture directe, stable et irréversible de l'état de pluripotence de l'épiblaste *in vitro*.

En résumé, lors de la dérivation des mESC en milieu FBS/LIF, les cellules de l'ICM ou de l'épiblaste précoce passent par un état transitoire "PGC-like" avant de se stabiliser à l'état naïf. Les lignées fluctuent spontanément entre l'état fondamental de pluripotence et l'état d'engagement, créant une fenêtre favorable à la différenciation. Le milieu 2i/LIF est capable de capturer directement l'état fondamental de pluripotence. Les mESCs sont alors l'équivalent *in vitro* des cellules de l'épiblaste précoce (Figure 19).

#### 4.1.4. Caractéristiques moléculaires

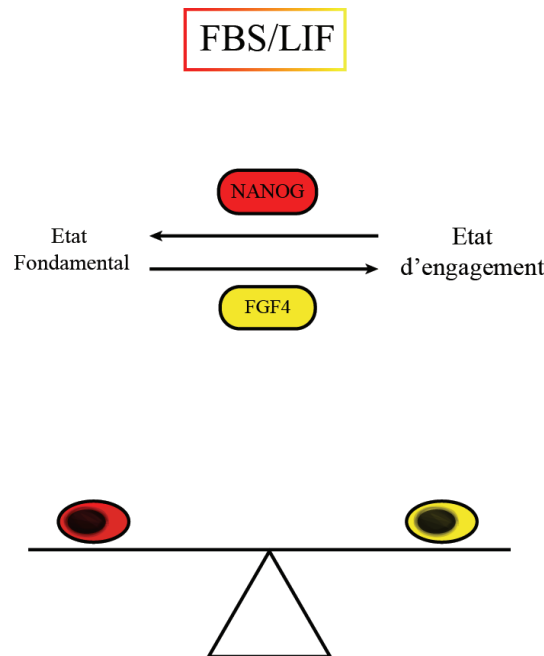
##### 4.1.4.1. La balance FGF/Nanog

On a proposé un modèle moléculaire permettant d'expliquer les fluctuations observées au sein de l'état naïf. Selon ce modèle, le passage spontané entre l'état fondamental et l'état d'engagement serait régulé par la balance entre les signaux de la voie FGF et le niveau d'expression de Nanog (Figure 20). Dans les mESCs (FBS/LIF), *Nanog* est exprimé de manière très hétérogène et fluctue alors que les autres gènes du noyau de pluripotence, *Oct4* et *Sox2*, sont exprimés de manière homogène (Niwa et al., 2000). La surexpression de Nanog permet de maintenir les mESCs autorenouvellement en absence de LIF et permet également de bloquer la différenciation des cellules induite par la voie FGF/ERK (Chambers et al., 2003). Étonnamment, des lignées de mESCs *Nanog*<sup>-/-</sup> ont pu être obtenues montrant que Nanog n'est pas vraiment indispensable au maintien de la pluripotence (Chambers et al., 2007). En revanche, une diminution ou l'absence d'expression de Nanog prédispose quand même les cellules à la différenciation (Chambers et al., 2007; Mitsui et al., 2003).

Comme nous l'avons vu précédemment, les signaux de la voie FGF/ERK permettent de passer de l'état fondamental à l'état d'engagement (Kunath et al., 2007; Stavridis et al., 2007),



alors que Nanog inhibe la différenciation et soutient l'autorenouvellement (Chambers et al., 2003, 2007; Mitsui et al., 2003). De manière cohérente, dans l'épiblaste précoce et les mESCs en milieu 2i/3i, les cellules ont une expression bi-allélique de *Nanog* (Miyazari and Torres-Padilla, 2012). Cela permettrait d'avoir un niveau d'expression plus élevé et plus homogène de Nanog, stabiliserait l'autorenouvellement des cellules. A l'inverse, pour l'épiblaste tardif et pour les mESCs en milieu FBS/LIF, l'expression mono-allélique de *Nanog* conduit à une hétérogénéité de niveaux d'expression, créant une fenêtre favorable pour la différenciation et le développement embryonnaire induit notamment par la voie FGF/ERK (Kunath et al., 2007; Miyazari and Torres-Padilla, 2012; Stavridis et al., 2007). La balance des signaux FGF/Nanog régulant le passage entre pluripotence et différenciation semble affecter les mESCs aussi bien que les cellules de l'ICM.



**Figure 20 : La balance FGF/Nanog.**

Schéma représentant le passage spontané des mESCs entre l'état d'engagement et l'état fondamental de pluripotence, influencé par la balance FGF/Nanog.



#### 4.1.4.2. *Le réseau de pluripotence naïve*

Dans les mESCs, le noyau de pluripotence constitué par les facteurs de transcription Oct4, Sox2, Nanog est renforcé et soutenu par plusieurs autres facteurs. L'ensemble forme ce que l'on peut appeler le réseau de pluripotence étendu. Un troisième niveau de régulation est constitué par les gènes de pluripotence que nous appellerons "accessoires".

- Les acteurs du réseau de pluripotence étendu:

Klf2 et Klf4 : Les gènes de la famille des Krüppel-Like Factor, *Klf2* et *Klf4*, sont essentiels à l'autorenouvellement des mESCs (Jiang et al., 2008). *Klf2* et *Klf4* ont une action redondante et partagent de nombreuses cibles communes avec Nanog (Jiang et al., 2008). *Klf4* est un des facteurs clefs du cocktail de reprogrammation (Takahashi and Yamanaka, 2006), et a pu être remplacé par *Klf2* tout en conservant la même efficacité (Feng et al., 2009; Nakagawa et al., 2008). La surexpression de *Klf2* et *Klf4* permet le maintien des mESCs en absence de LIF (Aksoy et al., 2014; Hall et al., 2009; Niwa et al., 2009b) alors que leurs inhibitions conjuguées entraînent la différenciation (Jiang et al., 2008). *Klf4* est un gène cible de la voie LIF/Stat3 (Bourillot et al., 2009), alors que *Klf2* est activé par Oct4. Ces deux gènes sont fortement exprimés dans les mESCs, et très faiblement dans les EpiSCs (Hall et al., 2009).

Le facteur de transcription à doigt de zinc Sall4 est également impliqué dans le maintien des mESCs dans l'état de pluripotence naïve (Sakaki-Yumoto et al., 2006; Yuri et al., 2009). Ce facteur semble aussi avoir un rôle positif sur la reprogrammation somatique en cellules iPSC. Son inhibition diminue l'efficacité de reprogrammation alors que sa surexpression l'augmente (Tsubooka et al., 2009). Sall4 active Oct4 et Nanog et forme un hétéro-complexe avec ces derniers (Yang et al., 2008). Enfin, la même équipe a mis en évidence l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif entre Oct4 et Sall4 (Yang et al., 2010a). Ces éléments permettent de conclure que Sall4 n'est pas impliqué directement dans la pluripotence mais, grâce à sa relation fonctionnelle avec Oct4, permet de stabiliser l'autorenouvellement des mESCs, notamment en bloquant la différenciation en trophectoderme (Yang et al., 2010a; Yuri et al., 2009).

Gbx2 et Tcfp2l1 : les facteurs de transcription Gastrulation Brain homeobox 2 (Gbx2) (Tai and Ying, 2013) et Tcfp2l1 (aussi connu sous le nom Crtr-1) (Martello et al., 2013) sont des gènes cibles de la voie LIF/Stat3 (Bourillot et al., 2009; Martello et al., 2013; Tai and Ying, 2013). Leur surexpression permet le maintien de l'autorenouvellement des mESCs en absence de LIF. De plus, Gbx2 améliore l'efficacité de reprogrammation de MEFs en miPSCs d'un facteur 3 (Tai and Ying, 2013). Martello *et al.* présentent Tcfp2l1 comme l'effecteur principal de Stat3. En effet, son inhibition réduit la clonogénicité des mESCs plus fortement que l'inhibition d'autres cibles de Stat3, comme Klf4 ou Gbx2 (Martello et al., 2013).

Esrrb : Esrr $\beta$ , pour Estrogen-Related Nuclear Receptor  $\beta$ , est un récepteur nucléaire orphelin qui joue également un rôle crucial dans la pluripotence. Il peut remplacer Klf4 dans le cocktail de reprogrammation, notamment en activant le gène *Klf4* endogène (Feng et al., 2009). De plus, nous avons vu précédemment (Chapitre 1-2) que l'activation de la voie Wnt par l'inhibition pharmacologique de la GSK3 $\beta$  (CHIR) permettait l'inactivation du facteur répresseur Tcf3 par la  $\beta$ Cat et permettait de soutenir l'autorenouvellement des mESCs. (Pereira et al., 2006; Wray et al., 2011; Yi et al., 2011). Des travaux ont montré que *Nanog* (Pereira et al., 2006) et *Esrrb* (Martello et al., 2012) étaient des cibles réprimées par Tcf3. La diminution ou l'absence d'Esrr $\beta$  bloque l'effet de l'inhibition de la GSK3 $\beta$ , alors que sa surexpression mime le phénotype de l'inhibition de la GSK3 $\beta$  ou des cellules *Tcf3*<sup>-/-</sup> (Martello et al., 2012). Ces résultats indiquent que *Esrrb* est l'une des cibles principales de la voie GSK3 $\beta$ /Tcf3 dans le maintien de l'autorenouvellement des mESCs. *Esrrb* était également la cible directe de Nanog la plus activée (Festuccia et al., 2012). La surexpression de Nanog permet de maintenir les mESCs en absence de LIF (Chambers et al., 2003). C'est également le cas pour la surexpression de *Esrrb* et ce, même dans des mESCs *Nanog*<sup>-/-</sup> (Festuccia et al., 2012). A l'inverse, la surexpression de Nanog, dans des cellules *Esrrb*<sup>-/-</sup>, ne permet pas de maintenir l'autorenouvellement en absence de LIF. Ces résultats placent Esrr $\beta$  en aval de Nanog, et en font une des cibles principales dans le mécanisme permettant à Nanog de stabiliser l'autorenouvellement en absence de cytokine (Festuccia et al., 2012). On peut noter que, tout comme Nanog (Chambers et al., 2007), Esrr $\beta$  n'est pas indispensable à l'autorenouvellement des mESCs en présence de LIF (Festuccia et al., 2012; Martello et al., 2012), ce qui soutient l'idée que la voie Wnt impliquant Nanog et Esrr $\beta$  est complémentaire et agit en parallèle de la voie LIF/Stat3 dans le maintien de l'autorenouvellement des mESCs.

De manière générale, les acteurs présentés ici, jouent un rôle clef dans le maintien de l'autorenouvellement et la stabilisation de la pluripotence des mESCs. De plus, la surexpression de la plupart de ces facteurs permet d'améliorer la reprogrammation des cellules somatiques en cellules iPS chez la souris. Ensemble, ils forment le réseau de pluripotence étendu.

- **Les gènes de pluripotence accessoires**

Dans le laboratoire, nous avons identifié plus de 20 gènes cibles de la voie LIF/Stat3 impliqués dans le contrôle de la pluripotence des mESCs (Aksoy et al, 2007; Bourillot et al., 2009). Parmi eux on retrouve de nombreux gènes composant le réseau de pluripotence étendu comme *Klf4*, *Gbx2*, *Sall4* et *Tcfp2l1*, mais aussi les gènes codant pour les sérine/thréonine kinases *Pim1* et *Pim3*, et les facteurs de transcription *Smad7*, *NrOb1* (*Dax1*), et *Klf5*.

Enfin d'autres acteurs, ne faisant pas (encore) partie du noyau de pluripotence étendu, participent à la régulation de la pluripotence des mESCs : *Tfe3* (Betschinger et al., 2013), *Tbx3* (Han et al., 2010b; Niwa et al., 2009b), *Lin28* (Marson et al., 2008b; Nam et al., 2011), et *Zscan4* (Amano et al., 2013; Falco et al., 2007; Jiang et al., 2013).

#### 4.1.4.3. *Le rôle du CHIR dans le milieu 2i/LIF*

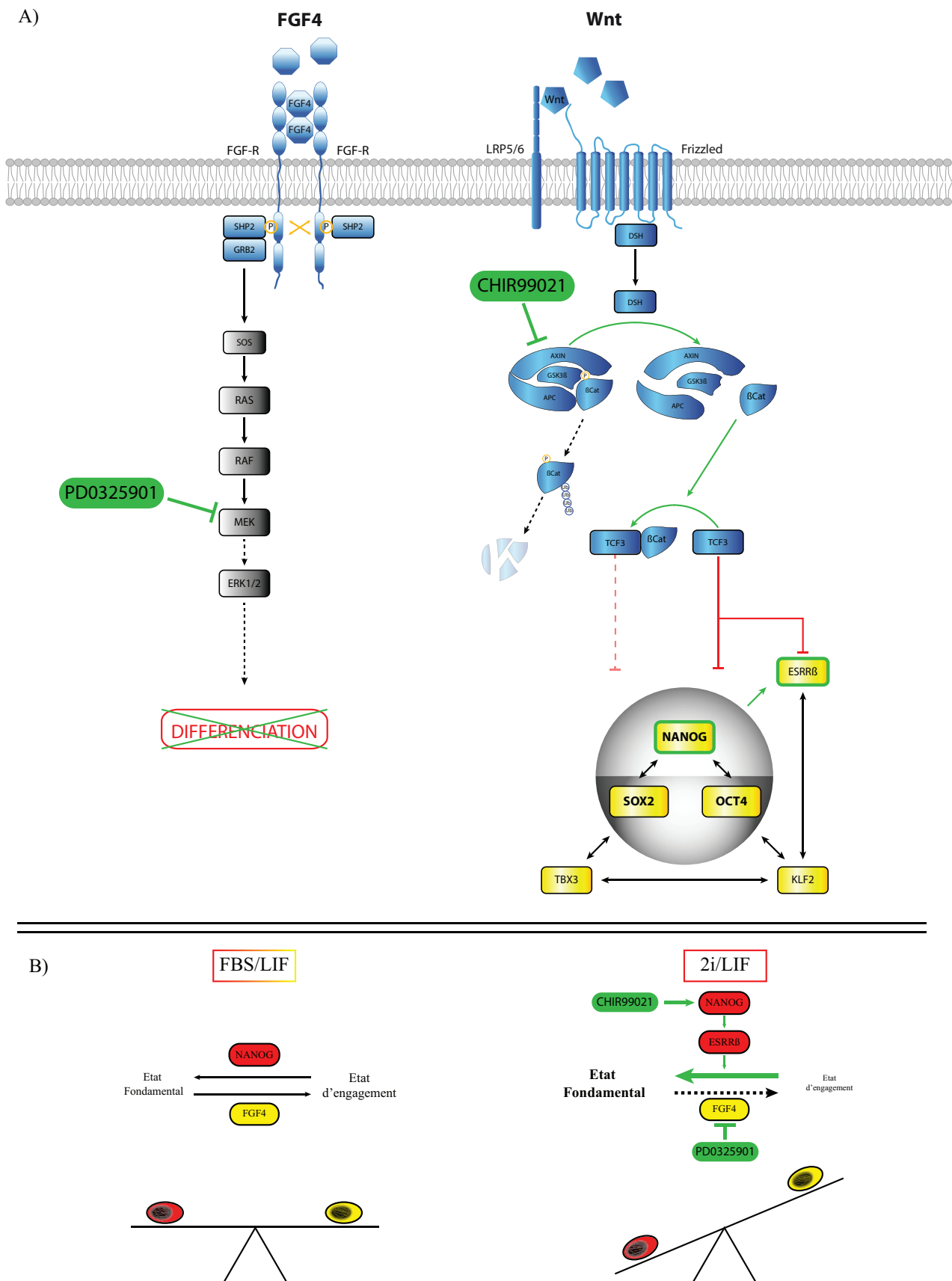
Lors de la première publication du milieu 2i/3i, Ying *et al.*, ont conclu que le CHIR améliorait la survie cellulaire et que son action agissait suivant un mécanisme indépendant de l'activation transcriptionnelle des facteurs Lef/Tcf par la  $\beta$ Cat (Ying *et al.*, 2008). En effet, ils ont surexprimé dans les mESCs un dominant négatif de LEF1, délété du site de fixation à la  $\beta$ Cat, ce qui empêche l'activation transcriptionnelle du complexe  $\beta$ Cat + Lef/Tcf (Ying *et al.*, 2008). De même, une étude plus récente montre que la surexpression d'une forme stabilisée de  $\beta$ Cat, délétée de son domaine Tcf-transactivateur, assure quand même son rôle dans le maintien de l'autorenouvellement des mESCs (Kelly *et al.*, 2011). Les auteurs concluent que la  $\beta$ Cat agit de manière indépendante aux Tcfs pour maintenir l'autorenouvellement, notamment en formant un complexe avec Oct4 et en augmentant son activité transcriptionnelle.

Cependant, comme nous venons de le voir, de nombreuses études ultérieures ont montré que l'action positive sur l'autorenouvellement de l'inhibition de la GSK3 $\beta$  était due à l'inactivation de l'activité répressive de Tcf3 lors de sa liaison avec la  $\beta$ Cat (Pereira *et al.*, 2006; Wray *et al.*, 2011; Yi *et al.*, 2011). Ces résultats ne sont pas forcément en désaccord (Figure 21A) dans la mesure où aucune activation transcriptionnelle de la  $\beta$ Cat n'est nécessaire pour soutenir l'autorenouvellement. En effet, la seule inactivation de Tcf3 par la  $\beta$ Cat suffit pour maintenir l'autorenouvellement des mESCs (Pereira *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2011), en permettant notamment l'activation indirecte de Nanog et Esrr $\beta$  (Festuccia *et al.*, 2012; Martello *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2006).

En résumé, dans le milieu 2i/3i, l'inactivation de la GSK3 $\beta$  par le CHIR permet de soutenir directement et indirectement le noyau de pluripotence en activant la voie Wnt/Nanog/Esrr $\beta$  (Figure 21B).

#### **La voie Wnt/Nanog/Esrr $\beta$ dans le milieu 2i et le développement embryonnaire**

L'activation de Nanog en aval de l'inhibition de la GSK3 $\beta$  permet de mieux comprendre l'action des 2i sur le développement embryonnaire. Comme exposé précédemment, la spécification de l'ICM en PrE et Epi, est contrôlée par l'action antagoniste de Nanog et la voie FGF/Grb2/Ras/MAPK. En effet, l'inhibition de la voie FGF réduit le nombre de cellules formant le PrE. De plus, Nichols *et al.* ont montré que la présence des 2i bloquait complètement la formation de l'Hypo et donc que l'inhibition de GSK3 $\beta$  avait un effet synergique avec l'inhibition de la voie FGF (Nichols *et al.*, 2009a). Cet effet synergique peut être expliqué par l'activation de Nanog dans les cellules de l'ICM, favorisant ainsi la formation de l'Epi.



**Figure 21 : L'action des 2i dans les mESCs**

(A) Schéma représentant l'action des 2i sur les voies de signalisation FGF/MAPK et Wnt/ $\beta$ Cat. L'inhibition de Tcf3 par la  $\beta$ Cat permet d'activer les gènes *Nanog*/*Esrr $\beta$* . (B) Action des 2i sur la balance FGF/*Nanog* permettant de stabiliser les mESCs à l'état fondamental de pluripotence.

#### 4.1.4.4. *Les caractéristiques des mESCs en milieu 2i/LIF*

- L'homogénéité des mESCs en milieu 2i/LIF

Comme cela a été exposé au début du chapitre, les mESCs cultivées en FBS/LIF forment une population hétérogène composée de plusieurs sous-populations positives ou négatives pour l'expression des gènes *Rex1*, *Stella*, *Pecam1* et *Nanog*. Ces différentes sous-populations, possèdent des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles différentes (Chambers et al., 2007; Furusawa et al., 2004; Hayashi et al., 2008; Toyooka et al., 2008). A l'inverse, dans l'état fondamental de pluripotence, les mESCs constituent une population relativement homogène. Les mESCs cultivées dans le milieu 2i/LIF sont caractérisées par une expression de *Nanog*, *Rex1* et *Esrrβ* beaucoup plus homogène que les mêmes cellules cultivées dans un milieu FBS/LIF (Wray et al., 2010)(Martello et al., 2012).

Une étude a comparé le transcriptome et l'épigénome de 3 lignées de mESCs dérivées et cultivées en milieu FBS/LIF ou en milieu 2i/LIF (Marks et al., 2012). Dans les deux conditions, les cellules expriment au même niveau les facteurs clefs du noyau de pluripotence étendu (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1*, *Stat3*, *Esrrb*, *Klf2*, *Klf4*, *Klf5*, *Fgf4*, *NR0b1*, *Tbx3*, *Tcf3*). En revanche, on retrouve une plus forte expression des marqueurs de lignages (*Pax6*, *T* et *Runx1*) pour les FBS-ES. En accord avec une étude précédente (Toyooka et al., 2008), on peut noter que, parmi les FBS-ES, les cellules *Rex1*<sup>+</sup> ont un profil d'expression plus proche des 2i-ES.

- L'épigénome en milieu 2i/LIF

Des différences dans l'épigénome ont été observées entre les cellules cultivées en FBS/LIF et en 2i/LIF. La répartition des marques activatrices H3K4me3 semble identique entre les deux conditions de culture (Marks et al., 2012). Toutefois, on peut noter une diminution des marques inhibitrices H3K27me3 sur les *loci* peu ou pas exprimés dans les 2i-ES, sans pour autant qu'il y ait un impact significatif sur les niveaux de transcription. On peut noter également une réduction du nombre de gènes possédant une marque bivalente (H3K4me3 + H3K27me3). Ainsi, parmi les 3000 promoteurs bivalents présents dans les FBS-ES, seuls 1000 sont conservés dans les 2i-ES, en raison de la diminution des marques H3K27me3. Encore une fois, bien que ces promoteurs ne possèdent plus que la marque activatrice H3K4me3, le niveau d'expression est souvent plus faible dans les 2i-ES que dans les FBS-ES (Marks et al., 2012).

Dans les 2i-ES, les auteurs ont trouvé une augmentation de la RNA-polIII au site d'initiation de la transcription (TSS) et une diminution dans les régions codantes. Ceci est cohérent avec le fait que les marques H3K27me3 bloquent l'élongation et avec l'hypothèse que, dans les 2i-ES, les RNA-polIII sont en pause au niveau des TSS (Marks et al., 2012).

#### 4.1.5. Caractéristiques fonctionnelles

Les cellules naïves possèdent des caractéristiques fonctionnelles particulières. Elles sont stables génétiquement et peu sujettes à la différenciation spontanée. Elles présentent un taux de clonogénicité élevé (proche de 100%) et sont, de fait, résistantes à la dissociation enzymatique à la trypsine et à l'ensemencement en cellule unique. Les cellules naïves prolifèrent très rapidement, avec notamment un temps de doublement de la population d'environ 16h. Enfin, elles possèdent une efficacité élevée de modifications ciblées de l'ADN par recombinaison homologue.

Le milieu 2i/LIF permet de stabiliser les mESCs à l'état fondamental de pluripotence. Par ailleurs, l'utilisation de ce milieu permet d'augmenter l'efficacité de reprogrammation (Silva et al., 2008a). De plus, les conditions 2i/LIF ont permis d'obtenir des mESCs à partir de lignées de souris connues pour être réfractaires à la dérivation (Brook and Gardner, 1997; Buehr and Smith, 2003; McWhir et al., 1996), comme les lignées CBA et MF1 (Ying et al., 2008), NOD (Non Obese Diabetic) (Hanna et al., 2010a; Nichols et al., 2009b) et C57BL/6 (Kiyonari et al., 2010). On a aussi pu dériver des lignées à partir d'une seule cellule (Boroviak et al., 2014). Toutes les lignées de mESCs ainsi obtenues ont la capacité de produire des chimères germinales, attestant de leur autorenouvellement à l'état naïf de pluripotence.

Les cellules ES de rat (rESCs) précédemment obtenues n'exprimaient pas tous les marqueurs de pluripotence et étaient incapables de produire efficacement des chimères (Brenin et al., 1997; Buehr et al., 2003; Fändrich et al., 2002; Ouhibi et al., 1995; Vassilieva et al., 2000). En revanche, la dérivation d'ICM de rat dans le milieu 2i/LIF a permis d'obtenir les premières rESCs possédant toutes les caractéristiques des cellules naïves, y compris la capacité à former des chimères germinales (Blair et al., 2012; Buehr et al., 2008; Li et al., 2008).

En conclusion de cette partie, les conditions de culture FBS/LIF ont permis d'obtenir des mESCs naïves de la lignée de souris 129. Elles ne permettent pas l'obtention de ESCs à partir d'autres souches de souris ou de rat. Le milieu 2i/3i permet au contraire d'obtenir des lignées de cellules ESCs à l'état fondamental de pluripotence et ce, dans tous les fonds génétiques étudiés jusqu'à maintenant (souris et rat).

**Tableau 1 : Caractéristiques comparées des cellules souches pluripotentes.**

	2c	Fondamental	Naïf	Intermédiaire	Amorcé
<b>Statut du chromosome X</b>		XaXa	XaXa		
<b>Oct4/Sox2/Nanog</b>		(+)	(+)		
<b>Pluripotence étendue</b>		(++++)	(+++)		
<b>miRNA</b>			miR-290		
<b>Gènes lignages</b>		(-)	(-/+)		
<b>Facteurs de croissances</b>		Aucun (Wnt)/(LIF)	LIF/BMP4		
<b>Trypsine</b>		+	+		
<b>Clonogénicité</b>		(++++)	(++++)		
<b>Formation Trophectoderme</b>					
<b>Chimère somatique</b>		(++++)	(++++)		
<b>Chimère germinale</b>		(++++)	(+++)		
<b>Génération des annexes embryonnaires</b>		(-)	(-)		



## 4.2. L'état amorcé

Lors de leur fabrication en 1998, les cellules ES humaines étaient présentées comme l'équivalent des mESCs puisqu'elles étaient dérivées à partir du même stade embryonnaire (Thomson, 1998). Par la suite, de nombreuses études ont souligné l'existence de certaines différences tant moléculaires que fonctionnelles entre les ESC de souris et d'Homme que l'on attribuait alors à des différences d'espèces (Dahéron et al., 2004; Gerami-Naini et al., 2004; Xu et al., 2001, 2002). La fabrication des cellules EpiSCs chez la souris a permis de définir un nouvel état de pluripotence et de classer les PSCs en deux groupes distincts : naïves et amorcées. De manière générale, on peut classer toutes les ESCs/iPSCs obtenues chez les autres espèces que la souris dans le groupe des cellules amorcées, à l'exception des PSCs de rat cultivées dans le milieu 2i/LIF.

### 4.2.1. Origine embryonnaire des cellules amorcées

Les EpiSCs de souris exemplifient l'état amorcé de pluripotence. Elles sont produites à partir de l'épiblaste post-implantatoire d'un embryon au stade ovocylindre (E5,5-6,5) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Une analyse globale du transcriptome a montré que les EpiSCs sont plus proches de l'épiblaste tardif (E5,5) dont elles dérivent, que de l'ICM du blastocyste (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Boroviak et al., 2014). Mais il est aussi possible de fabriquer des lignées EpiSCs à partir de l'ICM d'embryons préimplantatoires (E3,5) (Najm et al., 2011). Pour cela, on utilise un milieu de culture à base de KOSR (15%) et de FBS (5%). La dérivation est effectuée sur MEF sans facteur de croissance ajouté. On observe alors la formation de deux types de colonies, plates et en dôme. Les colonies en dôme cultivées dans un milieu de culture favorable à la capture de la pluripotence naïve forment des lignées de cellules mESCs. Les colonies plates produisent des lignées dont les caractéristiques moléculaires sont semblables à celles des cellules EpiSCs fabriquées à partir de l'épiblaste post-implantatoire (Najm et al., 2011). Ces travaux montrent que les conditions de culture priment sur le stade embryonnaire pour stabiliser les cellules de l'ICM à l'état amorcé ou naïf.

On peut penser que, lors de la dérivation de cellules humaines (et d'autres espèces), les conditions de culture permettent de maintenir les cellules à l'état amorcé. Ainsi, bien qu'elles soient dérivées de l'ICM, les hESCs correspondraient à un stade plus avancé du développement de l'embryon. En étudiant le devenir des cellules de l'ICM lors de la dérivation, on a identifié une structure transitoire se formant après 7 jours appelée PICMI (Post-ICM Intermediate).

Cette structure peut être isolée et congelée. Selon les auteurs, cette structure mime la transition par le stade épiblaste *in vitro* (O'Leary et al., 2012). En effet, on peut observer une extinction aléatoire d'un des deux Chr-X, ainsi que l'augmentation de marqueurs de l'épiblaste murin comme *Rex1*, *Gbx2*, *Foxd3*, *Ifitm1*, et *c-Kit*. Comme cela a été observé précédemment (Lengner et al., 2010), ils ont aussi noté la réactivation du Chr-X inactif dans certaines lignées lors des premiers passages des hESCs en condition hypoxique, ce qui renforce l'idée de l'état transitoire que représente le PICMI (O'Leary et al., 2012). De plus, les cellules entourant cette structure peuvent être assimilées à l'hypoblaste humain, avec une extinction de *Oct4* et une forte expression de *Gata4/6*. On peut noter que l'isolation de ces cellules n'a jamais permis l'obtention de hESCs. Ces observations suggèrent que, lors de l'établissement des hESCs, l'ICM mimerait le développement embryonnaire en formant des structures ressemblant à l'épiblaste et l'hypoblaste et que les hESCs seraient issues uniquement de l'épiblaste (O'Leary et al., 2012).

En résumé, les cellules amorcées de souris sont apparentées à l'épiblaste post-implantatoire de souris qu'elles soient dérivées à partir de l'ICM d'un blastocyste ou de l'épiblaste post-implantatoire. Il semblerait que, de la même manière, les cellules amorcées humaines correspondent à un stade plus avancé du développement embryonnaire que l'ICM dont elles sont issues.

#### 4.2.2. Caractéristiques moléculaires

- Expression des gènes et marqueurs de pluripotence de l'état amorcé

Il existe de nombreux marqueurs spécifiques de l'état de pluripotence amorcée. Ces marqueurs sont classiquement utilisés pour discriminer les états naïfs et amorcés de la pluripotence. En premier lieu, les gènes du noyau de pluripotence étendu, qui sont des marqueurs de l'état naïf de pluripotence, (*Rex1*, *Dax1*, *Pecam*, *Gbx2*, *Tbx3*, *Blimp1*, *Stella*, *Dazl*, *Klf2*, et *Klf4*) (Bao et al., 2009; Brons et al., 2007; Guo et al., 2009; Tesar et al., 2007)), sont peu ou pas exprimés dans les cellules EpiSCs et les hESCs. En revanche, elles expriment des marqueurs de l'épiblaste post-implantatoire, ainsi que des gènes de différenciation précoce tels que *Fgf5*, *Otx2*, *Eomes*, *Foxa2*, *brachyury* (*T*), *Gata6*, *Sox17* et *Cereberus1* (*Cer1*) (Tesar et al., 2007; Brons et al., 2007; Guo et al., 2009; Najm et al., 2011). Les cellules naïves (ICM/mESCs) expriment la E-Cadherine (*Cdh1*) alors que les cellules amorcées (EpiSCs et hESCs) expriment principalement la N-Cadhérine (*Cdh2*) (Bao et al., 2009). L'expression

différentielle des Cadhérines E et N discrimine les états de pluripotence naïf et amorcé (Bao et al., 2009). Les EpiSCs expriment *Klf5* à un niveau comparable aux mESCs mais montrent une plus faible expression de *Klf2* et *Klf4* (Guo et al., 2009). Les clusters miR-290 et miR-302 sont aussi exprimés de manière différentielle. Le cluster miR-290 est exprimé à un niveau plus élevé dans les cellules pluripotentes naïves, alors que le cluster miR-302 semble spécifique de l'état amorcé (Jouneau et al., 2012). Les EpiSCs ne présentent pas d'activité phosphatase alcaline. En revanche, les cellules de l'épiblaste de souris, mais également les hESCs, ont une forte activité phosphatase alcaline (Brons et al., 2007; Reubinoff et al., 2000; Tesar et al., 2007; Thomson, 1998). Chez la souris, l'inactivation aléatoire du chromosome X intervient au cours de la formation de l'épiblaste tardif. De manière cohérente, on retrouve un chromosome X inactif dans les lignées d'EpiSCs de souris (Guo et al., 2009). Ainsi, la présence d'un chromosome X inactif est une marque de l'état amorcé.

- **La dépendance aux facteurs de croissance**

Contrairement aux mESCs, les cellules EpiSCs (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007) ainsi que les hESCs (Vallier et al., 2005) sont dépendantes des voies de signalisation Activine et FGF et ne répondent pas à la voie LIF/Stat3 (Dahéron et al., 2004). L'inhibition pharmacologique des voies FGF/Activine induit la différenciation des hESCs (Vallier et al., 2005; Xu et al., 2005) et des EpiSCs (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007), alors que l'inhibition de la voie LIF ne perturbe ni la dérivation, ni la culture des hESCs et EpiSCs (Brons et al., 2007; Dahéron et al., 2004; Najm et al., 2011; Tesar et al., 2007). La dépendance aux facteurs de croissance est une des caractéristiques principales permettant de classer les cellules ES, obtenues chez les autres espèces, dans la catégorie des cellules amorcées.

### 4.2.3. Caractéristiques fonctionnelles

- La potentiel de colonisation des cellules amorcées

Les voies de signalisation qui contrôlent l'autorenouvellement constitue un critère important permettant de différencier les cellules de l'état amorcé et naïf. Cependant, la capacité à coloniser un embryon et à générer une chimère est la caractéristique fonctionnelle la plus marquante qui diverge entre ces deux états.

Chez la souris, les EpiSCs sont incapables de produire des chimères après micro-injection dans un blastocyste (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Avec la technique d'agrégation avec des embryons aux stades 8- et 16-cellules, l'efficacité est d'environ 0,5% (Brons et al., 2007). Dans une autre étude, les auteurs ont introduit une construction contenant le gène de la GFP sous contrôle de la région du promoteur du gène *Oct4* (Han et al., 2010a). Ils ont alors montré que les cellules EpiSC oscillent entre l'état GFP+ et GFP- dans un état métastable. Les EpiSCs GFP+, qui représentent seulement 0,5% de la population, présentent une capacité accrue à produire des chimères. L'efficacité atteint 8-10% (Han et al., 2010a). Ces auteurs précisent néanmoins que le promoteur permettant l'expression de la GFP n'est pas régulé de la même manière que le promoteur endogène du gène *Oct4*, puisqu'il n'y a pas de corrélation entre le niveau d'expression de la GFP et celui du gène *Oct4* endogène.

Les seuls embryons chimériques obtenus avec des cellules EpiSCs l'ont été après greffes des cellules dans des embryons post-implantatoire à E7. Pour cela, les cellules ont été greffées en petits amas directement dans l'épiblaste (Huang et al., 2012). Dans ces conditions, les cellules greffées se multiplient et participent à la gastrulation et la formation des trois feuillets embryonnaires. Si la greffe est réalisée à E8.5, stade où la gastrulation est achevée et l'épiblaste pluripotent a disparu, aucune colonisation n'est observée. Notons que des mESCs greffées dans les mêmes conditions sont incapables de coloniser les feuillets embryonnaires. Cette dernière observation suggère qu'il y a une incompatibilité entre les mESCs et l'épiblaste à E7, ce qui est cohérent avec l'idée que les mESCs correspondent à l'épiblaste préimplantatoire. On peut noter que cette technique nécessite la culture *in vitro* des embryons de souris et ne permet donc pas d'obtenir de souris chimériques.

De manière cohérente avec les résultats obtenus chez la souris, la micro-injection d'ESCs de singe rhésus dans des blastocystes ne permet pas de former de chimères (Tachibana et al., 2012). Cette observation confirme bien le statut amorcé des ESCs chez le primate.

- **La contrôle de la différenciation des cellules amorcées et naïves**

Tout comme les cellules naïves, les cellules amorcées sont capables de produire des corps embryoïdes et des tératomes et de se différencier dans les trois lignages embryonnaires. L'équipe de Roger Pedersen a cherché à définir le rôle des voies de signalisations FGF, Activine A et BMP4 dans la différenciation des hESCs (Vallier et al., 2009). Les hESCs ont été cultivées dans un milieu chimiquement défini, supplémenté de différentes combinaisons de facteurs de croissance et/ou d'inhibiteurs spécifiques à ces voies de signalisation. Sans faire la liste exhaustive des différents résultats, il ressort que l'ajout de BMP4 induit la différenciation des hESCs en hypoblaste (GATA4/6, SOX7) et trophoctoderme (CDX2, HAND1, EOMES), alors que l'inhibition de la voie Activine en présence de FGF, induit la différenciation en neur ectoderme (Vallier et al., 2009). Enfin, en utilisant différentes combinaisons de FGF, Activine A et BMP4, les auteurs ont défini un protocole en trois étapes pour induire la différenciation des hESCs en mésendoderme. Dans cette même étude, les auteurs ont comparé l'effet des différentes conditions de différenciation, définies avec les hESCs, sur des EpiSCs et des mESCs (Vallier et al., 2009). Ainsi, comme observé précédemment (Tesar et al., 2007), l'ajout de BMP4 induit la différenciation des EpiSCs en hypoblaste et trophoctoderme alors qu'il soutient l'autorenouvellement des mESCs. On peut noter que pour obtenir la même efficacité qu'avec les hESCs, l'inhibition de la voie Activine est nécessaire, suggérant que les EpiSCs ont une production paracrine d'Activine supérieure aux hESCs. Comme pour les hESCs, le protocole en trois étapes induit la différenciation des EpiSCs en mésendoderme, ce qui n'est pas le cas pour les mESCs (Vallier et al., 2009).

On avait déjà observé que les hESCs pouvaient former des trophoblastes (Xu et al., 2002), alors que les mESCs en étaient incapables (Beddington and Robertson, 1989). Cette différence de potentiel de différenciation avait alors été attribuée à une différence entre les espèces (Zwaka and Thomson, 2005). Nous venons de voir que les EpiSCs possèdent également la capacité de se différencier en cellules du trophoctoderme (Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2009). Au vu de ces résultats, on peut conclure que les EpiSCs et les hESCs partagent le même potentiel de différenciation, contrôlé par les mêmes voies de signalisation, voies qui divergent cependant de celles contrôlant la différenciation des mESCs. C'est un argument supplémentaire montrant que les EpiSCs sont l'équivalent murin des hESCs.

**Tableau 2 : Caractéristiques comparées des cellules souches pluripotentes.**

	2c	Fondamental	Naïf	Intermédiaire	Amorcé
<b>Statut du chromosome X</b>		XaXa	XaXa		XaXi
<b>Oct4/Sox2/Nanog</b>		(+)	(+)		(+)
<b>Pluripotence étendue</b>		(++++)	(+++)		
<b>miRNA</b>			miR290		miR302
<b>Gènes lignages</b>		(-)	(-/+)		(+++)
<b>Facteurs de croissances</b>		Aucun (Wnt)/(LIF)	LIF/BMP4		FGF/Act
<b>Trypsine</b>		+	+		(-)
<b>Clonogénicité</b>		(++++)	(++++)		(+)
<b>Formation Trophectoderme</b>					(+)
<b>Chimère somatique</b>		(++++)	(++++)		(-)
<b>Chimère germinale</b>		(++++)	(+++)		(-)
<b>Génération des annexes embryonnaires</b>		(-)	(-)		(-)

### 4.3. L'état transitoire 2C

Comme nous venons de le voir, les mESCs s'autorenouvellent à l'état naïf de pluripotence, état caractérisé par la fluctuation spontanée des cellules entre différentes sous-populations présentant des différences moléculaires et fonctionnelles. Récemment, une étude a identifié un nouvel état transitoire des mESCs en culture, associé à l'état des blastomères de l'embryon de souris au stade 2-Cellules (2C) (Macfarlan et al., 2012). De par leur régulation particulière et leur capacité proche de la totipotence, les mESCs-2C ont été qualifiées de "super state" (Surani and Tischler, 2012).

#### 4.3.1. Origine embryonnaire

La réactivation du génome du zygote intervient au stade 4-8 cellules chez la souris. Cependant, au stade 2-cellules, on peut déjà observer l'activation transitoire de certaines séquences rétrovirales endogènes (ERVs). La catégorie MuERV-L (murine endogenous retrovirus with leucine tRNA primer) représente à elle seule 3% des transcrits totaux du zygote au stade 2C (Kigami, 2002; Peaston et al., 2004). Elle est totalement réprimée dans les stades suivants du développement (Ribet et al., 2008). Macfarlan et collaborateurs ont créé un système rapporteur de l'état 2C en plaçant le gène de la protéine fluorescente dTomato sous contrôle du promoteur 5' LTR du MuERV-L le plus exprimé dans l'embryon 2C. En utilisant cette construction dans les mESCs, ils ont identifié une population de cellules Tomato+ représentant 0,5% à 1% des cellules en culture (Macfarlan et al., 2012). Cette population de cellules activant le MuERV-L a également été retrouvée dans des iPSCs de souris, montrant que ces cellules ne résultent pas d'une contamination minoritaire de cellules de l'embryon lors de la dérivation.

Grâce à une étude de lignage avec un système Cre/lox, les auteurs ont observé que toutes les cellules passent transitoirement par un stade où elles expriment le MuERV-L. La fréquence de leur passage par le stade MuERV-L<sup>+</sup> est évalué à environ 40 jours. On peut noter que la culture des mESCs dans le milieu 2i réduit la proportion de cellules Tomato<sup>+</sup>, ce qui est en accord avec l'idée que ce milieu permet de sélectionner les cellules à un état plus proche de l'épiblaste précoce.

### 4.3.2. Caractéristiques moléculaires

Une analyse du transcriptome des populations Tomato<sup>+</sup> et Tomato<sup>-</sup> a mis en évidence la surexpression de nombreux MuERVs ainsi que de gènes précédemment identifiés comme spécifiques au stade 2-cellules comme *Zscan4*, *Tctv1/3*, *Eif1a* (Figure 22A). Le résultat le plus surprenant concerne le noyau de pluripotence. L'analyse du transcriptome a révélé que le niveau de transcription de *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* était comparable entre les cellules Tomato<sup>+</sup> et Tomato<sup>-</sup> (Macfarlan et al., 2012). En revanche, l'analyse par immunomarquage a montré que les cellules Tomato<sup>+</sup> n'exprimaient pas Oct4, Sox2 et Nanog, indiquant une répression post-transcriptionnelle du noyau de pluripotence. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que les cellules Tomato<sup>+</sup> ou 2C correspondent au stade embryonnaire 2-cellules, stade où les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog ne sont pas encore exprimés.

Le passage à l'état 2C semble dépendant de l'ouverture de la chromatine (Macfarlan et al., 2012). Au sein de la population Tomato<sup>+</sup>, on retrouve une hypo-méthylation des séquences MuERV-L, comparées aux cellules Tomato<sup>-</sup>. De plus, on peut observer une augmentation de l'expression de séquences spécifiques aux cellules 2C dans des lignées de mESCs mutantes pour *kdm1a* codant pour LSD1 (histone Lysine-Specific Demethylase) ainsi que pour la HMT-G9a. Ces deux modificateurs d'histones favorisent la formation de l'hétérochromatine et semblent jouer un rôle négatif sur le passage vers l'état 2C. De manière cohérente, on retrouve une augmentation d'un facteur 10 du pourcentage de cellules Tomato<sup>+</sup> dans les cellules *Kdm1a*<sup>-/-</sup>. Par ailleurs, en traitant les mESCs au TSA (un inhibiteur des HDAC), on observe une augmentation de la proportion de cellules Tomato<sup>+</sup> d'un facteur 4. A partir de ces résultats, les auteurs concluent que les modifications d'histones contrôlent le passage à l'état 2C (Macfarlan et al., 2012).

### 4.3.3. Caractéristique fonctionnelles

Les blastomères de l'embryon au stade 2-cellules sont encore totipotents. Si les mESCs à l'état 2C sont vraiment l'équivalent des blastomères, elles devraient être totipotentes elles-aussi. Afin de tester cette hypothèse, les mESCs dTomato<sup>+</sup> et dTomato<sup>-</sup> ont été injectées dans des embryons aux stades morula et blastocyste. Les mESCs dTomato<sup>-</sup> colonisent l'ICM puis les trois feuillets embryonnaires. En revanche, les mESCs dTomato<sup>+</sup> sont aussi capables de coloniser le trophoctoderme puis le trophoblaste démontrant leur totipotence (Figure 22B).

**Figure 22 : L'état transitoire 2C.**



(A) Schéma représentant les caractéristiques moléculaires des cellules à l'état 2C : forte expression des rétrovirus endogènes et absence des protéines de pluripotence. (B) Les mESCs à l'état 2C sont totipotentes car capables de participer à la formation des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. Adapté de (Macfarlan *et al.*, 2012)

**Tableau 3 : Caractéristiques comparées des cellules souches pluripotentes.**

	2c	Fondamental	Naïf	Intermédiaire	Amorcé
<b>Statut du chromosome X</b>	NA	XaXa	XaXa		XaXi
<b>Oct4/Sox2/Nanog</b>	(-)	(+)	(+)		(+)
<b>Pluripotence étendue</b>	(-)	(++++)	(+++)		(-)
<b>miRNA</b>			miR290		miR302
<b>Gènes lignages</b>	(-)	(-)	(-/+)		(+++)
<b>Facteurs de croissances</b>	NA	Aucun (Wnt)/(LIF)	LIF/BMP4		FGF/Act
<b>Trypsine</b>	+	+	+		(-)
<b>Clonogénicité</b>	NA	(++++)	(++++)		(+)
<b>Formation Trophectoderme</b>	+				(+)
<b>Chimère somatique</b>	(++++)	(++++)	(++++)		(-)
<b>Chimère germinale</b>	(++++)	(++++)	(+++)		(-)
<b>Génération des annexes embryonnaires</b>	(+)	(-)	(-)		(-)

## 4.4. L'état intermédiaire de pluripotence

### Isolement des IESCs

Comme nous l'avons vu précédemment, les mESCs sont hétérogènes en culture et fluctuent entre différents états se situant entre l'état fondamental et amorcé de pluripotence. Une étude récente décrit la stabilisation de cellules dans un état intermédiaire (Chang and Li, 2013). Pour cela, les cellules mESCs ont été cultivées dans un milieu sans LIF, supplémenté en Activine A. Après 25 passages, les cellules sont capables de former des colonies de cellules indifférenciées aussi bien en présence d'Activine A qu'en présence de LIF. Aucune colonie ne peut se former en l'absence de l'un ou de l'autre de ces facteurs (Chang and Li, 2013). Ces cellules, appelées IESCs, sont donc dépendantes de l'Activine tout en gardant leur capacité de réponse au LIF. Cette double dépendance est aussi attestée par la sensibilité des cellules à l'inhibition du récepteur de l'Activine (SB43) qui induit une diminution rapide de l'expression de Nanog et la différenciation.

### Caractéristiques moléculaires

Les IESCs partagent des caractéristiques des deux états, amorcé et naïf. Comme les mESCs, elles forment des colonies en dôme, elles sont permissives à la dissociation par la trypsine, et possèdent une forte activité PA. Elles expriment Oct4, Sox2, et SSEA1. Au contraire, elles n'expriment pas le marqueur amorcé Otx2 (Chang and Li, 2013). Une analyse du transcriptome montre que les IESCs forment un cluster intermédiaire entre les ESCs et les EpiSCs. On observe une expression des gènes de pluripotence naïfs comme *Rex1*, *Stella*, *Pecam1*, *Klf4*, *Nanog*, *Fbxo15* et *Tbx3* inférieure à celle décrite dans les mESCs, mais supérieure à celle décrite dans les EpiSCs. A l'inverse, les cellules expriment certains marqueurs amorcés comme *Fgf5*, *Brachyury*, *Nodal*, *Pitx2*, *Otx2*, *Gata6*, *Foxa2*, *Nodal* et *Lefty1*, à un niveau plus faible que dans les EpiSCs. Une analyse des modifications d'histones H3K4m3 et H3K27me3 montre aussi un profil intermédiaire (Chang and Li, 2013).

### **Caractéristiques fonctionnelles**

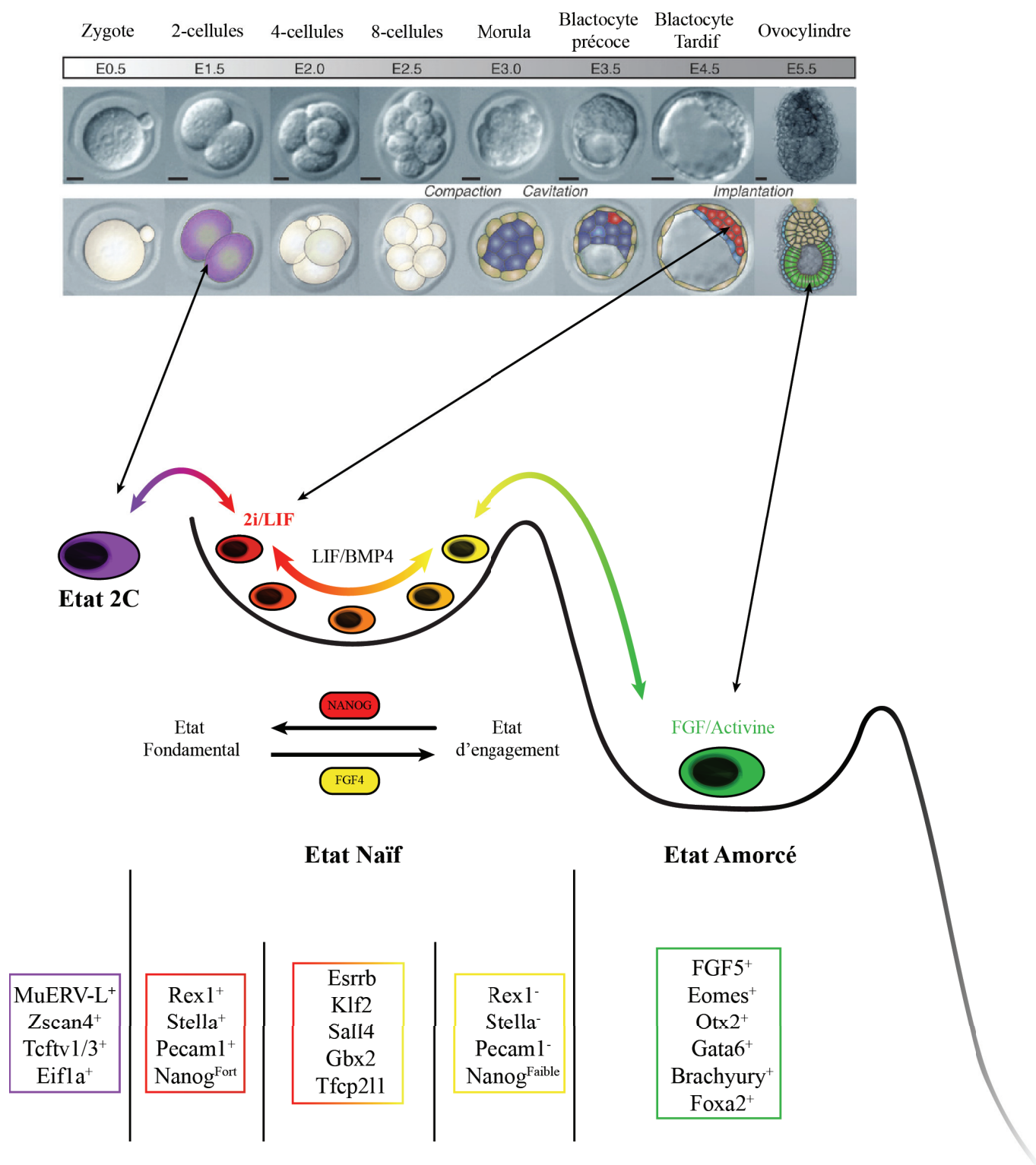
Comme toutes les cellules souches pluripotentes, les IESCs sont capables de produire des corps embryoides et des tératomes. Dans les corps embryoides, la cinétique d'expression des marqueurs de différenciation est proche de celle des EpiSCs, indiquant que les IESCs sont plus proches de l'engagement vers la différenciation (Chang and Li, 2013). Enfin, la capacité des IESCs à coloniser l'ICM a été testée par la formation de chimères d'agrégation avec des morulas. Au stade blastocyste, on a observé 33% des embryons avec une colonisation de l'ICM par les IESCs et 55% avec les mESCs. Ces résultats suggèrent que les IESCs ont conservé leur capacité à produire des chimères (Chang and Li, 2013). Cependant, on peut noter que les auteurs ne font pas mention de l'obtention de souris chimériques. De plus, ils précisent qu'à E9,5 les fœtus présentant un fort taux de chimérisme ont un développement retardé.

### **Un état intermédiaire plastique**

Les IESCs représentent une stabilisation d'un état intermédiaire qui est facilement convertible en ESCs ou EpiSCs (Chang and Li, 2013). En effet, en cultivant les IESCs dans le milieu N2B27 en présence de FGF/Activine, les cellules adoptent rapidement une morphologie d'EpiSCs avec des colonies plates, une forte expression d'Otx2 et un temps de doublement de population deux fois plus long. A l'inverse, le remplacement de l'Activine par le LIF convertit les IESCs en cellules équivalentes aux mESCs, comme le montre l'analyse de leur transcriptome.

### **Conclusion**

L'obtention des EpiSCs de souris a permis de définir deux états distincts de pluripotence, et par analogie, de mieux comprendre l'état de pluripotence des ESCs dans les autres espèces. La fluctuation des mESCs à l'état naïf, ainsi que la stabilisation d'un état intermédiaire de pluripotence, souligne l'existence d'un continuum d'états de pluripotence allant de l'état fondamental à l'état amorcé (Figure 23).



**Figure 23 : Les différents états de pluripotence.**

Schéma récapitulatif des différents états de pluripotence. Les flèches indiquent la correspondance de l'état des cellules avec l'embryon à différents stades de développement. En bas, sont indiqués les marqueurs spécifiques des différents états.

**Tableau 4 : Caractéristiques comparées des cellules souches pluripotentes.**

	2c	Fondamental	Naïf	Intermédiaire	Amorcé
<b>Statut du chromosome X</b>		XaXa	XaXa	XaXa	XaXi
<b>Oct4/Sox2/Nanog</b>	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>Pluripotence étendue</b>	(-)	(++++)	(+++)	(++)	(-)
<b>miRNA</b>			miR290		miR302
<b>Gènes lignages</b>	(-)	(-)	(-/+)	(++)	(+++)
<b>Facteurs de croissances</b>	NA	Aucun (Wnt)/(LIF)	LIF/BMP4	FGF/Act +(LIF)	FGF/Act
<b>Trypsine</b>	+	+	+	+	(-)
<b>Clonogénicité</b>	NA	(++++)	(++++)	(+++)	(+)
<b>Formation Trophectoderme</b>	+				(+)
<b>Chimère somatique</b>	(++++)	(++++)	(++++)	(+++)	(-)
<b>Chimère germinale</b>	(++++)	(++++)	(+++)	(-)	(-)
<b>Génération des annexes embryonnaires</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

## 4.5. La transition entre les différents états de pluripotence

### 4.5.1. La souris

Comme nous venons de le voir, les mESCs s'autorenouvellent dans un état métastable, fluctuant spontanément entre différents niveaux de pluripotence. De plus, à l'état intermédiaire de pluripotence, les cellules, sous l'influence des facteurs de croissance, sont capables de se stabiliser à l'état naïf aussi bien qu'à l'état amorcé. Outre l'état intermédiaire, des "ponts" ont été établis entre les différents états de pluripotence chez la souris, bien que le passage spontané d'un état à l'autre ne soit pas toujours possible. Le passage de l'état amorcé à l'état naïf est appelé réversion alors que l'on appelle conversion, le passage de mESCs en EpiSCs.

- La réversion (Epiblaste / EpiSCs → mESCS)

De nombreux travaux ont démontré qu'il était possible de reprogrammer des cellules EpiSCs en cellules naïves, équivalentes aux mESCs. Les premières études ont démontré que cette réversion survient spontanément dans les cultures d'épiblaste post-implantatoire (Figure 24A). Elle peut être mise en évidence grâce à un système de sélection approprié. En bref, on utilise un système "rapporteur" permettant l'expression de la GFP sous contrôle de l'enhancer distal – spécifique de l'état naïf - du gène *Oct4* (DE-Oct4). L'épiblaste dérivé de souris transgéniques DE-Oct4 est mis en culture dans un milieu supplémenté avec du FBS et du LIF. Après 2-5 semaines de culture, on observe des colonies de cellules GFP+, qui donnent ensuite naissance à des lignées de mESCs revertées (rESCs), en tous points similaires aux lignées dérivées d'un ICM E3,5 (Bao et al., 2009). Un phénomène similaire a été mis en évidence dans les cultures de cellules EpiSC. Cultivées en milieu 2i/LIF, une faible proportion des cellules EpiSCs est capable de réverter vers un phénotype mESC. Cependant l'efficacité est inférieure à  $10^{-6}$  (Hall et al., 2009).

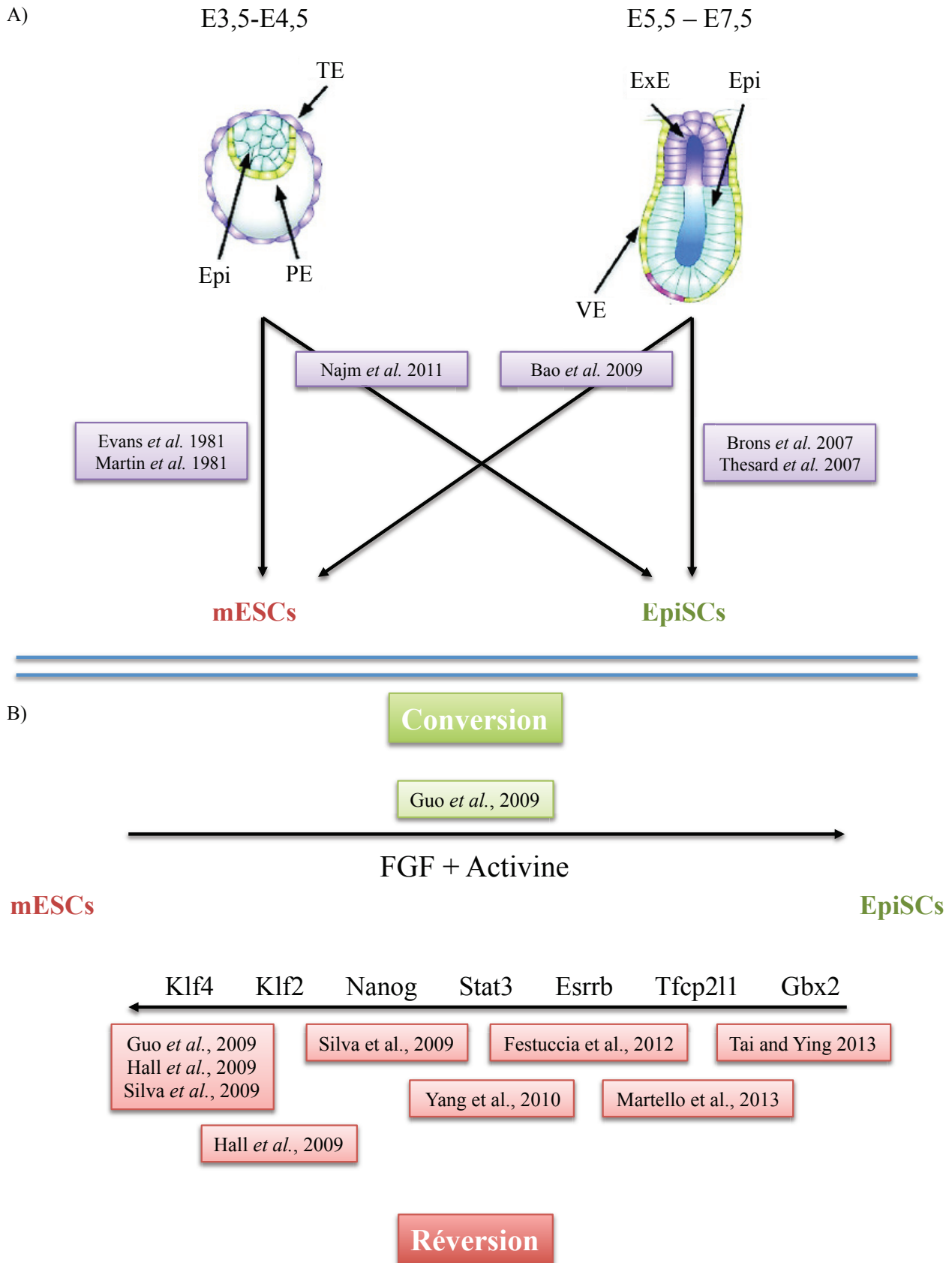
Des approches plus complexes ont été mises en œuvre pour reprogrammer des cellules EpiSCs en mESCs. Ces approches utilisent toutes la surexpression transitoire de facteurs de transcription afin de promouvoir cette réversion et en augmenter ainsi l'efficacité. Par exemple, la surexpression de Klf4 (Guo et al., 2009; Hall et al., 2009; Silva et al., 2009) ou de Klf2 (Hall et al., 2009), couplée à la culture des cellules dans le milieu 2i/LIF a permis de réverter les EpiSCs en mESCs avec une efficacité de 0,2-2%. De même, la surexpression de Nanog

combinée à la culture en milieu 2i/LIF, induit la réversion des EpiSCs avec une efficacité comprise entre 1 et 10% (Silva et al., 2009). La surexpression de *Esrrb*, un gène cible de Nanog, induit également la réversion de EpiSCs (Festuccia et al., 2012). Enfin, la réversion de cellules EpiSCs en mDESCs a été également obtenue grâce à la protéine fusion Stat3-ERT2 et la culture dans le milieu 2i/LIF supplémenté avec le tamoxifène (Yang et al., 2010b). La voie LIF/Stat3 joue donc un rôle clef dans le processus de réversion.

Plusieurs gènes appartenant au noyau de pluripotence étendu, ou des gènes impliqués de manière accessoire dans la régulation de la pluripotence, se révèlent capables de stimuler la réversion des EpiSCs en mESC (Figure 24B). C'est le cas des récepteurs nucléaires NR5a1 et NR5a2 (Guo and Smith, 2010), ainsi que de deux effecteurs majeurs de Stat3, Tfc2l1 (Martello et al., 2013) et Gbx2 (Tai and Ying, 2013). Tfc2l1 est présenté comme l'effecteur principal de la voie LIF/Stat3 (Martello et al., 2013). De manière cohérente, la surexpression de Tfc2l1 permet d'obtenir des mESC dans le milieu 2i et avec la même efficacité en présence ou en absence de LIF (Martello et al., 2013).

Il est important de noter que la surexpression de ces facteurs de transcription n'est nécessaire que de manière transitoire. Comme pour la reprogrammation somatique, une fois que les cellules ont atteint l'état naïf de pluripotence, elles acquièrent une indépendance au(x) transgène(s) et peuvent être maintenues en culture après extinction ou excision de ce(s) dernier(s).





**Figure 24 : Transition en l'état amorcé et l'état naïf chez la souris.**

(A) Regroupe les premiers articles ayant dérivé des lignées de mESCs et EpiSCs. (B) Conversion et réversion entre EpiSCs et mESCs ainsi que les différents facteurs dont la surexpression permet la réversion.

- **La conversion (ICM / mESCs → EpiSCs)**

Comme nous l'avons vu précédemment, il est possible de dériver des mESCs et des cellules EpiSCs à partir de l'ICM d'un blastocyste à E3,5 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Najm et al., 2011) (Figure 24A). L'obtention d'un type ou l'autre de cellules dépend des conditions de culture et principalement des facteurs de croissance qui soutiennent l'autorenouvellement des cellules à l'état naïf (LIF/BMP4) ou à l'état amorcé (Activine/FGF). La conversion de l'ICM en cellules EpiSCs est rapide et efficace. En effet, après dissociation des excroissances de l'ICM dans un milieu dépourvu de facteur de croissance, les premières colonies formées présentent une morphologie d'EpiSCs ou de mESCs (Najm et al., 2011).

Les colonies ressemblant aux EpiSCs sont incapables de se maintenir dans les conditions FBS/LIF. Ces résultats indiquent que la conversion de l'ICM en EpiSCs intervient au cours des premiers jours de culture en absence de LIF. L'efficacité de la conversion est supérieure à l'efficacité de réversion de l'épiblaste tardif en mESCs. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les EpiSCs représentent un état de développement plus avancé que l'ICM, qui continuerait son développement *in vitro* pour se stabiliser au stade EpiSCs.

La transition mESCs → EpiSCs est également très efficace. Ainsi, lorsqu'elles sont placées dans le milieu de culture des cellules EpiSCs, la majorité des mESCs se convertissent spontanément en cellules EpiSCs en seulement quelques passages (Guo et al., 2009) (Figure 24B).

- **La reprogrammation vers les différents états de pluripotence**

La reprogrammation de MEFs par la surexpression du cocktail OSKM, a permis d'obtenir des iPSCs à l'état amorcé et à l'état naïf de pluripotence (Han et al., 2011). En effet, les MEFs en cours de reprogrammation, cultivées dans un milieu chimiquement défini en présence de FGF/Activine vont générer des iPSCs semblables aux EpiSCs (Han et al., 2011). Les auteurs précisent que l'ajout de cellules nourricières au cours de la reprogrammation favorise l'obtention d'iPSCs naïves, ce qui est probablement dû à leur sécrétion paracrine de LIF. Ces travaux démontrent que la surexpression des mêmes facteurs de croissance permet l'obtention d'iPSCs naïves ou amorcées dont la stabilisation dépend uniquement des conditions de culture et principalement des facteurs de croissance (Han et al., 2011).

### 4.5.2. L'Homme

L'obtention des EpiSCs de souris a permis de classer les hESCs parmi les cellules amorcées. Depuis, la réversion des EpiSCs à l'état naïf de pluripotence a nourri de nombreux espoirs concernant la stabilisation de l'état naïf chez d'autres espèces et notamment chez l'homme. Fortes des nombreuses études traitant de la réversion des EpiSCs, plusieurs équipes se sont employées à réverter des hESCs ou à reprogrammer directement des hiPSCs vers l'état naïf.

- **La réversion des hESC vers l'état naïf : les premiers pas**

Les différentes stratégies de réversion et de reprogrammation vers l'état naïf qui ont été employées, ainsi que certaines caractéristiques des cellules obtenues sont résumées dans le (Tableau 5).

De ces différentes études, aucun consensus ne ressort quant à l'état des cellules humaines naïves. Certaines des cellules obtenues sont résistantes à la dissociation enzymatique par la trypsine (Hanna et al., 2010b; Ware et al., 2009), alors que d'autres ne le semblent pas (Li et al., 2009; Wang et al., 2011). Ces différents travaux ont eu recours aux conditions 2i/LIF pour promouvoir et démontrer l'état naïf des PSCs humaines. Cependant, le maintien des cellules dans les conditions N2B27+2i/LIF nécessitent souvent la surexpression des transgènes (Buecker et al., 2010; Hanna et al., 2010b; Wang et al., 2011). En absence d'expression de transgènes, les cellules peuvent être stabilisées dans des conditions moins stringentes (KOSR +/- cellules nourricières) (Buecker et al., 2010; Li et al., 2009; Wang et al., 2011). En effet, la présence de KOSR et de cellules nourricières est susceptible de fournir certains facteurs comme l'Activine permettant de soutenir l'autorenouvellement des hESCs. De plus, outre la privation de LIF, on ne retrouve généralement pas de démonstration formelle de la dépendance vis à vis de la voie LIF/Stat3, ni de son activation fonctionnelle (Buecker et al., 2010; Li et al., 2009; Wang et al., 2011). Seule l'étude de Hanna et collaborateurs montre que la surexpression d'un dominant négatif de STAT3 induit la différenciation alors que la surexpression d'un STAT3 constitutivement actif permet le maintien des hiPSCs en absence de LIF (Hanna et al., 2010b). Cependant, ces cellules ne sont pas stables et ne peuvent être cultivées plus de 15-20 passages (Hanna et al., 2010b). Enfin, la réactivation du deuxième Chr-X est un argument apporté par les auteurs en faveur de la réversion des cellules humaines. Or la présence de deux chromosome X actifs dans les hESCs a été observée dans des conditions hypoxiques (Lengner et al., 2010) et ne constitue pas un critère suffisant, à lui seul, pour conclure à la naïveté des cellules.

**Tableau 5 : Les premières hPSCs révertées vers l'état naïf.**

Auteurs	Type cellules	Transgènes	Dépendance aux transgènes	Milieu de culture	Marqueurs	Démonstration fonctionnelle de la pluripotence	Caractéristiques fonctionnelles naïves	Stabilité
<b>Ware 2009</b>	hESCs			Butyrate Sodium HDACi	SSEA3/4 Tra1-60/81	Corps embryoides Tératome	Dissociation enzymatique Absence FGF XaXa	>30 passages
<b>Li 2009</b>	hiPSCs	Oct4, Sox2, Nanog, Lin28	Non	2i/LIF + Alki	SSEA3/4 Tra1-60/81	Corps embryoides Tératome	MAPK indépendant TGFβ indépendant	>20 passages
<b>Buecker 2010</b>	hiPSCs	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog	Oui	FBS/LIF	SSEA1	Absence de Corps embryoides Tératome	MAPK indépendant Recombinaison homologue	
<b>Wang 2011</b>	hiPSCs	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc RARg NR5a2	Non	2i/LIF	SSEA3/4 Tra1-60/81	Corps embryoides Tératome	Dissociation accutase XaXa FGF indépendant LIF dépendant	
<b>Hanna 2010</b>	hiPSCs	OSKM + Oct4/Klf4 ou Klf2/Klf4	Non	2i/LIF + Forskoline	SSEA3/4 Tra1-60/81	Corps embryoides Tératome	Dissociation Trypsine XaXa LIF dépendant Stat3 dépendant FGF indépendant TGFβ indépendant	15-20 passages
<b>Hanna 2010</b>	hESCs			2i/LIF + Forskoline	SSEA3/4 Tra1-60/81	Corps embryoides Tératome	Dissociation Trypsine XaXa LIF dépendant Stat3 dépendant FGF indépendant TGFβ indépendant	15-20 passages

- **Stabilisation de l'état naïf chez l'homme**

D'autres travaux plus récents font état de la stabilisation de hPSCs à l'état naïf de pluripotence, sans avoir recours à la surexpression de facteurs de transcription (Chan et al., 2013; Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Valamehr et al., 2014; Ware et al., 2014). Ces études apportent également une caractérisation plus poussée de l'état naïf de pluripotence chez l'homme (Chan et al., 2013; Chen et al., 2014; Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Valamehr et al., 2014; Ware et al., 2014). Dans plusieurs de ces études, les auteurs ont réalisé un crible de différentes combinaisons de petites molécules en se basant sur des systèmes "rapporteurs" dépendant de l'expression de *NANOG* (Chan et al., 2013), *OCT4* (Gafni et al., 2013), de l'enhancer distal d'*OCT4* (Theunissen et al., 2014). La composition des différentes conditions de culture est détaillée dans le (Tableau 6).

Tous les cocktails de petites molécules ont en commun les 2i (MEKi / GSK3βi) mais diffèrent en ce qui concerne le reste des petites molécules sélectionnées. Cependant, il semblerait qu'une réduction de la concentration du GSK3βi soit plus adaptée à la culture des hPSCs, en comparaison des conditions optimum définies chez la souris (Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014). De plus, la majorité de ces milieux contiennent du FGF2 et/ou de l'Activine, ce qui diffère des études précédentes où seul le LIF était ajouté.

En utilisant ces différentes conditions, les auteurs ont démontré qu'il était possible de dériver des hESCs à l'état naïf (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Ware et al., 2014) mais également de réverter des iPSCs ou hESCs à l'état naïf de pluripotence (Chan et al., 2013; Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Valamehr et al., 2014; Ware et al., 2014) (Chen et al., 2014) (Takashima et al., 2014). Cependant la réversion dans les conditions définitives de culture peut nécessiter une étape intermédiaire. Par exemple l'utilisation transitoire d'un autre milieu permettant de faciliter la transition vers l'état naïf (Valamehr et al., 2014; Ware et al., 2014). En accord avec leur précédente étude (Ware et al., 2009), les auteurs utilisent transitoirement un milieu contenant des HDACi (Butyrate de Sodium + SAHA) alors que Valamehr *et al.* montrent que l'inhibition des TGFβs améliore la reprogrammation mais est délétère pour la culture à long terme (Valamehr et al., 2014). Une étude récente montre que la surexpression transitoire de KLF2 et de NANOG permet de cultiver les hESCs dans le milieu t2iLgö, ce qui conduit à leur réversion (Takashima et al., 2014).

**Tableau 6 : Conditions de culture des différentes hPSCs à l'état naïf.**

		Gafni 2013	Chan 2013	Valamehr 2014	Ware 2014	Theunissen 2014	Takashima 2014	Chen 2014
Conditions de culture	Nom	NHSM	3iL	FMM	2iF	5i/L/A	t2iLgö	TL2i
		KO-DMEM	mTeSR1 (bFGF/ TGFβ)	DMEM F12	DMEM F12	N2B27	N2B27	KO-DMEM
		Albumax+N2 ou KOSR		20% KOSR	20% KOSR			20% KOSR
		Matrigel/ Vitronectine	MEF	Matrigel/ Vitronectine	Matrigel	MEF	MEF/ Lam511	Matrigel
	Transgènes						(Klf2 + Nanog)*	Stat3ER <sup>t2</sup>
		MEKi	MEKi	MEKi	MEKi	MEKi	MEKi	MEKi
		GSK3βi CHIR	GSK3βi BIO	GSK3βi CHIR	GSK3βi CHIR	GSK3βi CHIR	GSK3βi CHIR	GSK3βi CHIR
		JNKi						
		P38i						
		(PKCi) Gö6983					PKCi Gö6983	
Inhibiteurs		(ROCKi)		ROCKi		ROCKi	(ROCKi)	
			BMPi					
						BRAFi		
						SRCi		
Facteurs de croissance		FGF2		FGF2	FGF2	(FGF2)		
		TGFβ				Activine A		
		hLIF	hLIF	hLIF		hLIF	hLIF	hLIF
								Tamoxifène

"()" : molécules optionnelles

"\*" : Expression transitoire

Enfin, dans le laboratoire, des hESCs sur-exprimant la protéine fusion STAT3-ER<sup>l2</sup> ont pu être révertées dans un état intermédiaire grâce à l'action synergique d'un traitement au LIF et au Tamoxifène (induisant l'activation de STAT3-ER<sup>l2</sup>) appelée condition TL. Ces cellules ont ensuite pu être révertées à l'état naïf par l'ajout des 2i (TL+2i) (Chen et al., 2014).

Toutes les cellules cultivées dans ces conditions possèdent les caractéristiques cardinales des cellules pluripotentes humaines. Les cellules expriment SSEA3/4 et TRA1-60/81 et sont négatives pour SSEA1 (Chan et al., 2013; Chen et al., 2014; Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Valamehr et al., 2014; Ware et al., 2014). De plus, elles conservent leur capacité à se différencier dans les trois feuillets embryonnaires lors de la formation de corps embryoïdes et de tératomes. Contrairement à certaines études précédentes (Hanna et al., 2010b; Li et al., 2009), toutes ces conditions de culture permettent la propagation stable des cellules à long terme en garantissant l'intégrité génétique des lignées (Chan et al., 2013; Chen et al., 2014; Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Valamehr et al., 2014; Ware et al., 2014). On peut toutefois remarquer une augmentation du nombre de lignées présentant des anomalies chromosomiques lors de passages par traitement à la trypsine (Theunissen et al., 2014), ce qui avait déjà été rapporté par une précédente étude (Chan et al., 2008).

### **Les voies de signalisation**

La dépendance aux différentes voies de signalisation a été étudiée de manière plus ou moins approfondie. On peut noter que la culture des hPSCs dans les conditions N2B27 + 2i/LIF induit une différenciation des cellules en neurectoderme (Theunissen et al., 2014; Ware et al., 2014), ce qui est cohérent avec de précédentes observations (Hirano et al., 2012; Li et al., 2011a). En revanche, il semble possible de stabiliser les cellules dans le milieu 2i par l'ajout de FGF2 (Ware et al., 2014). Le LIF semble améliorer ou permettre le maintien des cellules en culture dans ces différents milieux (Chan et al., 2013; Chen et al., 2014; Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Valamehr et al., 2014), bien que l'activation de la voie LIF/STAT3 n'ait pas toujours été démontrée dans ces travaux.

L'équipe de Ng a montré qu'un traitement de 96h aux 3i (MEKi+Bio+Dorsomorphin) rendait les cellules sensibles au LIF, ce qui peut s'expliquer par une augmentation du niveau de gp130 (Chan et al., 2013). De plus, ils ont observé une augmentation du niveau de P-Stat3 corrélée avec une augmentation de l'expression des cibles de STAT3 : *SOCS3* et *KLF4* (Chan et al., 2013). Les auteurs montrent également que les cellules restent sensibles à l'inhibition des

voies Pi3K, FGF et Activine (Chan et al., 2013). Cela reste cohérent avec le fait que, bien que les auteurs ne supplémentent pas leur milieu avec du FGF2 ou de l'Activine A, ils utilisent le mTeSR1 comme milieu de base, celui-ci contenant déjà de fortes concentrations de FGF2/TGF $\beta$ .

L'équipe de Rudolf Jaenisch a montré que l'ajout de LIF semblait stabiliser les cellules dans le milieu 5i/L/A mais que son absence ne modifiait pas l'expression des gènes de pluripotence (Theunissen et al., 2014). De plus, l'ajout de FGF et/ou d'Activine A améliore l'efficacité et la cinétique de réversion, alors que l'absence combinée des deux facteurs induit la diminution des gènes de pluripotence et une augmentation de la différenciation spontanée (Theunissen et al., 2014).

Ware *et al.* ont montré que des hESCs pouvaient être dérivées dans le milieu 2i/FGF (MEKi+GSK3 $\beta$ i), ce qui indique que le signal du FGF passe par une autre voie que les MAPK (Ware et al., 2014). Ils ont observé que les cellules étaient sensibles au traitement à la rapamycine, suggérant l'activation de mTOR par le FGF dans le milieu 2i/FGF.

Enfin, dans le milieu NHSM, l'ajout de FGF2 et de TGF $\beta$ 1 joue un rôle positif alors que l'inhibition pharmacologique de ces deux voies a un rôle négatif sur le maintien des cellules dans ce milieu (Gafni et al., 2013). Ces travaux révèlent aussi que les cellules sont dépendantes de la voie LIF/STAT3. Les cellules se différencient en absence de LIF ou en présence d'un dominant négatif de STAT3, alors que la surexpression d'une forme constitutivement active de Stat3 permet leur maintien en NHSM en absence de LIF (Gafni et al., 2013).

Les hESCs révertées par l'expression transitoire de Klf2 et Nanog puis cultivées dans le milieu t2iLgö sont l'exception (Takashima et al., 2014). En effet, un traitement avec des inhibiteurs pharmacologiques des voies FGF et Activine indique que ces cellules sont indépendantes de ces voies de signalisation. Cependant, la dépendance de ces cellules à la voie LIF n'a pas du tout été abordée dans cette étude (Takashima et al., 2014). La diminution de l'expression KLF4 et TFCEP2L1 par la technique de ShRNA, réduit l'efficacité de formation de colonies des hESCs cultivées en t2iLgö alors qu'elle n'affecte pas les hESCs cultivées en KOSR/FGF. Ces deux gènes cibles de STAT3 semblent nécessaires à l'autorenouvellement des hESCs-t2iLgö uniquement, démontrant l'activation du réseau de pluripotence étendu dans ces cellules.

Dans les conditions TL ou TL2i, l'absence de LIF ou de tamoxifène induit la différenciation des hESCs (Chen et al., 2014). De plus, ces cellules présentent une augmentation du niveau d'expression de tous les acteurs de la voie LIF (LIFR, GP130,



JAK1/2/3 et STAT3). Enfin, le niveau élevé de phosphorylation de STAT3 et STAT3-ER<sup>12</sup>, ainsi que leur localisation nucléaire, corrélé avec l'augmentation de l'expression des gènes cibles de STAT3, confirme bien l'action synergique du LIF et du Tamoxifène. Ces résultats démontrent la dépendance des TL et TL2i-hESCs à la voie LIF (Chen et al., 2014). On peut noter que, comme le démontre l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, les cellules (TL et TL2i) sont complètement indépendantes des signaux de la voie FGF mais restent sensibles à l'inhibition de la voie Activine (Chen et al., 2014).

Indépendamment des différents cocktails d'inhibiteurs utilisés, il semblerait que les hPSCs à l'état naïf restent dépendantes des voies FGF et/ou Activine, en plus d'acquérir la sensibilité/dépendance au LIF. Ces résultats semblent indiquer une régulation différente des cellules humaines et murines.

### **Les caractéristiques naïves des cellules humaines**

Les hPSCs obtenues par les différentes équipes présentent de nombreuses caractéristiques communes, propres aux cellules naïves de souris. En effet, les cellules : (i) sont plus proches morphologiquement des mESCs et forment des colonies en dôme ; (ii) peuvent être dissociées enzymatiquement en suspension unicellulaire sans perte massive de viabilité ; (iii) présentent une diminution du temps de doublement de la population ; (iiii) présentent une réactivation du deuxième Chromosome X dans les lignées femelles (Chan et al., 2013; Chen et al., 2014; Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Valamehr et al., 2014; Ware et al., 2014). De plus, certaines études ont montré que, contrairement aux cellules amorcées, les hESCs naïves présentaient une activation prédominante de l'enhancer distal d'*Oct4* (Chen et al., 2014; Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Ware et al., 2014).

Une étude précédente a rapporté une diminution globale des marques H3K27me3 dans les mESCs cultivées en milieu 2i/LIF (Marks et al., 2012). En effet, les différents travaux révèlent une diminution des marques répressives H3K27me3 dans les hPSCs naïves, notamment sur les promoteurs des gènes de développement (Chan et al., 2013; Chen et al., 2014; Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Valamehr et al., 2014; Ware et al., 2014). En accord avec les résultats précédemment publiés chez la souris (Marks et al., 2012), on observe une perte des marques bivalentes au niveau des sites d'initiation de transcription (TSS) des gènes de développement, accompagné d'une augmentation des marques activatrices H3K4me3 et H3K27Ac au niveau des promoteurs des gènes spécifiques de l'état naïf (Chan et al., 2013; Chen et al., 2014; Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014).

## **Le(s) profil(s) d'expression des cellules humaines naïves**

Dans toutes ces études, une analyse du transcriptome montre un rapprochement entre les hPSCs naïves et les mESCs ([Chan et al., 2013](#); [Chen et al., 2014](#); [Gafni et al., 2013](#); [Takashima et al., 2014](#); [Theunissen et al., 2014](#); [Valamehr et al., 2014](#); [Ware et al., 2014](#)). On peut voir globalement une réduction de certains marqueurs amorcés et une augmentation de certains marqueurs naïfs. Cependant, chaque étude présente un profil d'expression différent et met en avant l'expression de certains marqueurs propres à chaque étude, c'est pourquoi il est difficile de présenter un profil consensuel.

En se basant sur plusieurs études antérieures d'autres équipes, Valamehr *et al.* ont constitué une liste "objective" de 80 gènes permettant de discriminer l'état naïf et amorcé ([Valamehr et al., 2014](#)). De manière cohérente, ils ont observé une augmentation des gènes naïfs et une diminution de la majorité des gènes spécifiques de l'état amorcé dans les hESCs en milieu FMM ([Valamehr et al., 2014](#)).

Chan *et al.* ont comparé leur résultat aux données publiées ([Yan et al., 2013](#)), obtenues à partir du single cell RNA-seq de l'embryon humain à différents stades de développement ([Chan et al., 2013](#)). Ils ont montré que la majorité des gènes surexprimés dans les hESCs en 3iL étaient fortement exprimés par l'épiblaste préimplantatoire. De manière cohérente, les gènes surexprimés dans les hESCs amorcées sont ceux surexprimés par les cellules lors de la dérivation et des premiers passages ([Chan et al., 2013](#)). Ces résultats semblent indiquer que les hESCs 3iL sont plus proches de l'état de l'embryon. Enfin, les auteurs montrent une fixation différentielle de OCT4 et NANOG sur de nombreuses cibles entre les hESCs à l'état amorcé et naïf, ce qui suggère la mise en place d'un autre réseau de pluripotence dans les hESCs 3iL. ([Chan et al., 2013](#)).

Theunissen *et al.* ont comparé les profils d'expression des hESCs 5i/L/A ([Theunissen et al., 2014](#)) avec les résultats publiés dans les autres études ([Chan et al., 2013](#); [Gafni et al., 2013](#); [Ware et al., 2014](#)). Parmi les gènes les plus surexprimés dans les cellules en 5i/L/A, par rapport aux hESCs amorcées, on retrouve : *DPPA5*, *DPPA3* (*Stella*), *DPPA2*, *REX1*, *KLF4*, *KLF5*, *TFCP2L1* et *NANOG* ([Theunissen et al., 2014](#)). Les auteurs montrent que, dans les autres études, les hPSCs obtenues ne présentent pas d'augmentation du niveau d'expression de ces gènes ([Chan et al., 2013](#); [Gafni et al., 2013](#); [Ware et al., 2014](#)). De plus, ils montrent par RNA-fish que l'expression de *NANOG* est homogène au sein de la population de hESCs 5i/L/A, confirmant que l'augmentation du niveau d'expression de Nanog est due à une augmentation affectant toutes les cellules.

Takashima et collègues ont également comparé le profil d'expression des hESCs t2iLgö (Takashima et al., 2014) avec les résultats d'autres groupes (Chan et al., 2013; Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Ware et al., 2014), ainsi qu'avec le profil d'expression de l'embryon humain (Yan et al., 2013). Les hESCs t2iLgö et 5i/L/A apparaissent plus proches des mESCs et de l'embryon humain que les cellules cultivées en NHSM ou 3iL qui forment un groupe proche des hESCs en conditions classiques (KOSR/FGF). Les hESCs t2iLgö et 5i/L/A expriment certains marqueurs naïfs (*NANOG*, *KLF4*, *KLF5*, *DPPA3*, *TBX3*, *TFCP2L1* et *FGF4*) à un niveau comparable aux mESCs, ce qui n'est pas le cas pour les hESCs NHSM ou 3iL (Takashima et al., 2014). Enfin, en utilisant la liste objective de gènes sélectionnés par le "International Stem Cell Initiative" (Adewumi et al., 2007), ils montrent que les hESCs 2iLgö sont plus proches de l'état des mESCs que les hESCs obtenues par les autres groupes.

L'analyse du profil d'expression de différentes lignées de hESCs cultivées en présence de FGF, TL et TL2i confirme bien l'existence de trois états distincts (Chen et al., 2014). De plus, ces données ont été comparées aux résultats publiés dans deux autres études (Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014) ainsi qu'aux profils d'expression d'embryons aux stades morula et blastocyste (Vassena et al., 2011). Il ressort que les cellules cultivées en 5i/L/A, NHSM et TL sont proches entre elles et de l'état de l'embryon. De manière cohérente avec les résultats de Theunissen *et al.* il ressort que les hESCs cultivées en 5i/L/A sont plus proches de l'embryon que les hESCs cultivées en NHSM. On peut noter que les TL2i-hESCs forment un groupe distinct des autres hESCs naïves. Enfin, en comparant également l'ensemble de ces résultats avec le profil d'expression de mESCs et de EpiSCs, il apparaît que les cellules obtenues en TL2i et 5i/L/A sont plus proches des mESCs que les hESCs cultivées dans les autres conditions. Ces différentes comparaisons montrent que les TL2i-hESCs sont stabilisées dans un état naïf inédit, proche des mESCs et différent des autres cellules humaines naïves.

## **Démonstration fonctionnelle de la pluripotence naïve des cellules humaines ?**

Les mESCs présentent une tolérance élevée vis à vis de la modification ciblée de l'ADN par recombinaison homologue. Gafni et collaborateurs ont montré que les hPSCs cultivées en milieu NHSM avaient une capacité de recombinaison homologue accrue (Gafni et al., 2013). Par ailleurs, les auteurs ont testé la capacité de colonisation des hESCs NHSM en les injectant dans des morula de souris E2,5. L'analyse des embryons 24h après injection montre que 80% des blastocystes contiennent des cellules GFP+ (< 2% avec des hPSCs cultivées en milieu standard) (Gafni et al., 2013). Le transfert d'embryons micro-injectés dans des femelles pseudo gestantes a permis d'obtenir des fœtus chimériques entre E8,5-10,5, présentant une forte contribution des cellules humaines dans plusieurs tissus. Ces résultats n'excluent pas la formation d'hétérocaryons pouvant expliquer l'obtention de chimères inter-espèces. Malgré tout, l'ensemble de ces résultats constitue la démonstration la plus aboutie de l'obtention et de la stabilisation à long terme de PSCs humaines à l'état naïf de pluripotence (Gafni et al., 2013).

Il faut toutefois préciser que l'équipe de Rudolf Jaenisch a tenté de reproduire ces résultats, avec les lignées de hESCs 5i/L/A (Theunissen et al., 2014), mais également avec des cellules issues du laboratoire de Jacob Hanna cultivées dans le milieu NHSM (Gafni et al., 2013), et ce, sans succès malgré le grand nombre d'essais (1500 embryons injectés) (Theunissen et al., 2014).

L'ensemble de ces résultats démontre qu'il est possible de cultiver les hPSCs dans un état de pluripotence différent de l'état amorcé. De plus, la réversion des hESCs/hiPSCs semble possible sans surexpression d'aucun facteur. Les cellules présentent de nombreuses caractéristiques communes avec les mESCs, cependant il existe de nombreuses divergences dans la régulation moléculaire et le profil d'expression des lignées présentées par les différentes équipes. La démonstration formelle de l'obtention de cellules s'auto-renouvelant à l'état naïf passe par la génération de chimères, ce qui n'est évidemment pas possible chez l'homme. En considérant la pluripotence comme un continuum, on peut affirmer que ces cellules ne sont plus à l'état amorcé, cependant on ne peut pas conclure que ces cellules aient atteint l'état fondamental de pluripotence tel qu'il est défini chez la souris.

### 4.5.3. Le lapin

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules pluripotentes de lapin s'auto-renouvellent à l'état de pluripotence amorcée. Elles sont dépendantes des voies FGF/Activine et partagent de nombreuses caractéristiques avec les EpiSCs, dont notamment leur incapacité à coloniser efficacement l'embryon (Fang et al., 2006; Honda et al., 2008; Wang et al., 2007).

Chez le lapin, seuls deux articles de la même équipe font état de la réversion de RbPSCs vers l'état naïf de pluripotence (Honda et al., 2013; Kimiko et al., 2014). En se basant sur les travaux de réversion des cellules humaines, Honda et collaborateurs ont surexprimé de façon stable le gène *Oct4* humain dans des RbPSCs (Honda et al., 2013) et des RbESCes (Kimiko et al., 2014). Ces cellules ont été transférées sur cellules nourricières dans le milieu N2B27+20%KOSR supplémenté de 2i/LIF + Forskoline + Kenpaullone. Les cellules ont adopté une morphologie de mESCes, formant des colonies en dôme, et ont conservé leur capacité à former des tératomes démontrant ainsi leur pluripotence (Honda et al., 2013; Kimiko et al., 2014). Cependant, aucune caractérisation des voies de signalisation n'a été faite, en particulier leur éventuelle dépendance au LIF. Les auteurs ne rajoutent ni FGF ni Activine dans le milieu. Toutefois la présence des cellules nourricières n'exclue pas la production paracrine de ces deux facteurs.

Les auteurs ont testé la capacité de colonisation des PSCs révertées en les micro-injectant dans des embryons au stade 8-cellules. 48h après injection, l'analyse des embryons au stade blastocyste montre une colonisation de l'ICM de plusieurs embryons. La même procédure a été employée avec des embryons de souris, montrant que ces cellules ont également la capacité de former des embryons chimères inter-espèces. Bien qu'aucune donnée quantitative n'ait été fournie, ces résultats suggèrent que ces PSCs ont une capacité accrue de colonisation (Honda et al., 2013; Kimiko et al., 2014). Concernant les iPSCs, aucune analyse à un stade plus tardif n'ayant été réalisée, les résultats présentés ne permettent pas de conclure que ces cellules ont également acquis la capacité de participer au développement et de générer des lapins chimériques (Honda et al., 2013). En revanche, dans la deuxième étude la capacité de participer au développement a été évaluée. Ainsi, aucun lapin chimérique n'a été observé à E11,5 ni à la naissance, démontrant que les RbESCes révertées sont incapables de participer au développement embryonnaire (Kimiko et al., 2014).

Aucune caractérisation moléculaire de ces cellules n'a été publiée. De plus, leur capacité à générer des chimères n'ayant pas été démontrée, ces résultats ne permettent pas de conclure à l'obtention de PSCs naïves chez le lapin, ni d'en définir les caractéristiques.

## 5. Le lapin comme modèle d'étude de la pluripotence

- Le lapin : un modèle intéressant

En considérant le développement embryonnaire précoce et donc par extension des PSCs, la souris semble être l'exception et non la règle. En effet, les études récentes traitant du développement embryonnaire précoce des autres espèces comme l'homme, le porc et le bovin ont observé des différences notables dans les mécanismes de mise en place des premiers lignages. Il en découle que l'étude de la pluripotence chez l'homme n'est pas forcément bien modélisée par la souris.

Le lapin apparaît ici comme un modèle d'étude intéressant. Il est phylogénétiquement plus proche de l'homme que la souris (Graur et al., 1996). De plus, bien que peu de données soient disponibles concernant le développement embryonnaire précoce, il semblerait que le lapin suive une régulation et une cinétique d'expression des gènes proches des autres espèces et différentes de la souris. Par exemple, à l'inverse de la souris on retrouve l'expression du gène *Oct4* dans les cellules de l'ICM et du TE jusqu'au stade blastocyste tardif comme c'est le cas chez le porc, le bovin et l'homme (Cauffman et al., 2005; van Eijk et al., 1999; Kirchhof et al., 2000; Kuijk et al., 2012).

De plus, l'étude des différents états de pluripotence nécessite la possibilité de tester la capacité de formation de chimères, ce qui est impossible chez l'homme. En comparaison du bovin et du porc, le lapin présente l'avantage d'être un petit animal à faible coût d'élevage. De plus, l'obtention d'un grand nombre d'embryons n'est pas une limitation chez le lapin en comparaison des autres espèces. Par exemple, Rodriguez *et al.* ont testé le rôle de différentes voies de signalisation chez l'embryon de porc (Rodriguez, 2012). Cependant, le faible nombre d'embryons obtenu, n'a pas permis de démontrer statistiquement l'effet de certains traitements. Chez le lapin, on peut obtenir 35 embryons en moyenne par lapine (116 maximum au laboratoire). Cela permettrait de tester facilement la capacité de colonisation des cellules.

- Les cellules souches pluripotentes chez le lapin

Le lapin est déjà un modèle d'étude de nombreuses maladies humaines comme athérosclérose ou les maladies cardio-vasculaires (Duranthon et al., 2012). L'obtention de cellules de lapin possédant les mêmes caractéristiques que les mESCs permettrait de développer les techniques de transgénèse et faire du lapin un outil pertinent pour la recherche fondamentale et médicale.

Cependant, très peu d'études ont rapporté l'obtention de cellules pluripotentes chez le lapin (Fang et al., 2006; Honda et al., 2008, 2009, 2013; Wang et al., 2007). De par leurs caractéristiques, les cellules de lapin peuvent être classées parmi les cellules amorcées. Généralement, les cellules obtenues sont dépendantes de la voie FGF/Activine. De plus, elles ne semblent pas capables de coloniser efficacement l'embryon de lapin. Par ailleurs, la pluripotence chez le lapin est mal définie et aucune caractérisation poussée n'a été réalisée sur les PSCs de lapin. On peut également préciser que l'obtention de lignées d'iPSCs de lapin n'avait pas encore été rapportée lors du début de mon projet de thèse. Enfin, aucune caractérisation visant à définir l'état de pluripotence n'a été apportée chez le lapin. De plus, la réversion de RbPSCs à l'état naïf de pluripotence n'a pas été réellement étudiée. En effet, une seule équipe a présenté la réversion de PSCs de lapin (Honda et al., 2013; Kimiko et al., 2014). Toutefois, aucune caractérisation de ces cellules n'a été apportée. Il en ressort plusieurs interrogations :

Qu'elles sont les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des PSCs de lapin ?

Est-il possible de réverter les PSCs de lapin à vers l'état naïf de pluripotence ?

Qu'elles sont les caractéristiques des cellules "naïves" chez le lapin ?

Est ce que le LIF peut promouvoir la pluripotence chez le lapin ?

Est que ces cellules ainsi produites ont la capacité à coloniser l'embryon ?

Dans le but d'apporter des réponses à ces questions, j'ai d'abord entrepris de fabriquer et caractériser des lignées de cellules iPSCs de lapin. Ainsi 3 lignées de RbPSCs dépendantes du FGF2 ont été obtenues par reprogrammation de fibroblastes grâce à la surexpression des transgènes humains *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, et *c-MYC*. La caractérisation moléculaire et fonctionnelle de ces lignées, en comparaison à 4 lignées de RbESCs dérivées au laboratoire, a fait l'objet d'une publication (Osteil et al., 2013).

La caractérisation de ces lignées d'iPSCs a révélé que bien que possédant certaines caractéristiques propres aux cellules naïves, les RbiPSCs sont incapables de coloniser efficacement l'embryon. C'est pourquoi j'ai ensuite entrepris de réverter les cellules RbiPSCs vers l'état naïf de pluripotence. En se basant sur les études traitant de la réversion chez la souris et l'homme, nous avons choisi de surexprimer de façon stable les transgènes humains *KLF2* et *KLF4*. Les deux lignées obtenues appelées EKs, montrent une signature moléculaire plus proche de l'état de l'embryon ainsi qu'une capacité accrue à la colonisation de l'ICM d'embryon au stade blastocyste. La caractérisation moléculaire et fonctionnelle des cellules EKs fait l'objet d'une deuxième publication en cours de soumission.



# RESULTATS

*« Il ne suffit pas de dire : je me suis trompé ;  
il faut dire comment on s'est trompé. »*

Claude Bernard (1813-1878)

# ***RESULTATS***

## **Introduction**

Les premières lignées de ESCs obtenues chez le lapin semblent stabilisées à l'état amorcé de pluripotence, comme en témoignent leur dépendance aux voies FGF/Activine ainsi que leur incapacité à coloniser l'embryon préimplantatoire de lapin (Fang et al., 2006; Honda et al., 2008; Wang et al., 2007). Ces différentes études montrent que les RbESCs possèdent bien toutes les caractéristiques cardinales de cellules pluripotentes, cependant aucune étude n'a précisément étudié le statut de pluripotence, ni définit les caractéristiques liées à l'état de pluripotence chez cette espèce. Dans ce cadre, mon travail de thèse a eu pour but d'étudier et de définir les états de pluripotence chez le lapin en se basant sur des propriétés permettant de discriminer les états naïf et amorcé définis chez d'autres espèces. Outre la question fondamentale liée à l'étude des états de pluripotence, une des motivations principales est d'obtenir des lignées cellulaires capables de coloniser l'embryon en vue de générer des chimères et ainsi développer les techniques de transgénése chez le lapin.

Ce chapitre est divisé en 2 sous parties, la première décrira les travaux qui ont permis d'aboutir à l'obtention et à la caractérisation de trois lignées RbiPSCs, en comparaison à quatre lignées de RbESCs. Seront également présentées une analyse globale du transcriptome de l'ICM et de l'épiblaste tardif de lapin et leur comparaison avec les différentes lignées de PSCs obtenues au laboratoire. Enfin la seconde partie regroupera les travaux visant à réverter les RbiPSCs vers l'état naïf de pluripotence.

# 1. Les cellules souches pluripotentes chez le lapin

## 1.1. Obtention des iPSCs de lapin

A mon arrivée au laboratoire, des lignées de RbESCs venaient d'être dérivées par un autre doctorant, Pierre Osteil. Par ailleurs, l'obtention d'iPSCs chez le lapin n'avait pas encore été publiée. Nous avons cherché à obtenir des RbiPSCs en émettant l'hypothèse que la reprogrammation pourrait stabiliser les cellules à un état de pluripotence différent que ne le permet la dérivation. Durant mon stage de 2<sup>ème</sup> année de Master, j'ai assisté Marielle Afanassieff lors de la dérivation de fibroblastes issus de biopsies d'oreilles de lapin New Zeland. J'ai ensuite participé à la mise au point du protocole de reprogrammation chez le lapin. Le protocole d'obtention d'iPSCs de lapin ainsi que les méthodes permettant leur caractérisation ont fait l'objet d'une publication technique (Afanassieff et al., 2014) (Article 1, pages 123-147). La reprogrammation de fibroblastes a été induite par la surexpression des gènes humains *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* à l'aide de vecteurs lentiviraux. Parmi les 12 lignées de RbiPSCs dépendantes du FGF2 ainsi obtenues, trois présentent une réactivation des gènes endogènes de pluripotence *Oct4* et *Nanog* et une extinction complète des transgènes.

## 1.2. Caractérisation et comparaison des RbiPSCs et des RbESCs

La première étape de mon projet doctoral a été de caractériser ces trois lignées de RbiPSCs en comparaison avec quatre lignées de RbESCs obtenues et caractérisées par Pierre Osteil. Ces travaux ont été publiés dans le journal *Biology Open* (Osteil et al., 2013) (Article 2, pages 149-173). Après avoir vérifié que ces lignées cellulaires possédaient bien toutes les caractéristiques cardinales des PSCs, nous les avons comparées sur différents critères tels que l'expression des marqueurs de surface et la régulation du cycle cellulaire. Une attention particulière a été portée sur les propriétés permettant de discriminer les états naïf et amorcé à savoir : (i) l'activité de l'enhancer distal de *Oct4* ; (ii) le niveau d'expression de marqueurs associés à la pluripotence naïve et amorcée ; (iii) leur capacité à coloniser l'embryon préimplantatoire. Il ressort que les RbESCs et les RbiPSCs se distinguent sur de nombreux critères. Les RbESCs ont une régulation du cycle cellulaire proche des cellules somatiques alors que les propriétés du cycle cellulaire des RbiPSCs apparaissent plus proches des cellules pluripotentes. De plus, seules les

RbiPSCs présentent certaines caractéristiques propres à l'état naïf de pluripotence. Elles possèdent une forte activité de l'enhancer distal de *Oct4*, expriment fortement la E-cadhérine et n'expriment pas la N-Cadhérine, caractéristiques partagées par les mESCs et l'ICM. L'analyse moléculaire révèle également que les RbiPSCs surexpriment, par rapport aux RbESCs, certains marqueurs spécifiques de l'état naïf. De plus, l'expression différentielle de SSEA1 et SSEA4 a mis en évidence l'existence de sous-populations aux caractéristiques moléculaires et fonctionnelles différentes. Ainsi les RbiPSCs SSEA1+ ont une signature moléculaire plus proche des cellules de l'ICM que les RbESCs. Enfin, seules les RbiPSCs montrent une capacité à coloniser l'ICM après agrégation avec une morula.

# **Article n°1 : Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in Rabbits**

(Publié dans *Methods in Molecular Biology* en novembre 2014)

**Article n°2 : Induced pluripotent stem  
cells derived from rabbits exhibit  
some characteristics of naïve  
pluripotency**

(Publié dans *Biology Open* en mai 2013 pages 613 à 628)

# Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency

Pierre Osteil<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Yann Tapponnier<sup>1,2,3,\*</sup>, Suzy Markossian<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Murielle Godet<sup>1,2,3,4</sup>, Barbara Schmaltz-Panneau<sup>5</sup>, Luc Jouneau<sup>5</sup>, Cédric Cabau<sup>6</sup>, Thierry Joly<sup>3,7,8</sup>, Thierry Blachère<sup>1,2,3</sup>, Elen Góczy<sup>9</sup>, Agnieszka Bernat<sup>1,2,3,†</sup>, Martine Yerle<sup>10</sup>, Hervé Acloque<sup>10</sup>, Sullivan Hidot<sup>1,2,3</sup>, Zsuzsanna Bosze<sup>9</sup>, Véronique Duranthon<sup>5</sup>, Pierre Savatier<sup>1,2,3,4,§</sup> and Marielle Afanassieff<sup>1,2,3,4,§</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U846, Stem Cell and Brain Institute, 18 Avenue du Doyen Jean Lépine, F-69500 Bron, France

<sup>2</sup>Stem Cell and Brain Institute, F-69500 Bron, France

<sup>3</sup>Université de Lyon, F-69100 Villeurbanne, France

<sup>4</sup>INRA, USC1361, F-69500 Bron, France

<sup>5</sup>INRA, Biology of Development and Reproduction, F-78352 Jouy-en-Josas, France

<sup>6</sup>INRA, SIGENAE, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France

<sup>7</sup>ISARA-Lyon, F-69007 Lyon, France

<sup>8</sup>VetAgroSup, UPSP ICE, F-69280 Marcy l'Etoile, France

<sup>9</sup>Institute of Animal Biotechnology, Agricultural Biotechnology Center, H-2100 Godollo, Hungary

<sup>10</sup>INRA, UMR444, F-31326 Castanet Tolosan, France

\*These authors contributed equally to this work

†Present address: Laboratory of Molecular Diagnostics, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, Medical University of Gdansk, Poland

§Authors for correspondence (marielle.afanassieff@inserm.fr; pierre.savatier@inserm.fr)

Biology Open 0, 1–16

doi: 10.1242/bio.20134242

Received 25th January 2013

Accepted 2nd April 2013

## Summary

Not much is known about the molecular and functional features of pluripotent stem cells (PSCs) in rabbits. To address this, we derived and characterized 2 types of rabbit PSCs from the same breed of New Zealand White rabbits: 4 lines of embryonic stem cells (rESCs), and 3 lines of induced PSCs (r iPSCs) that were obtained by reprogramming adult skin fibroblasts. All cell lines required fibroblast growth factor 2 for their growth and proliferation. All rESC lines showed molecular and functional properties typically associated with primed pluripotency. The cell cycle of rESCs had a prolonged G1 phase and a DNA damage checkpoint before entry into the S phase, which are the 2 features typically associated with the somatic cell cycle. In contrast, the r iPSC lines exhibited some characteristics of naïve pluripotency, including resistance to single-cell dissociation by trypsin, robust activity of the distal enhancer of the mouse *Oct4* gene, and

expression of naïve pluripotency-specific genes, as defined in rodents. According to gene expression profiles, r iPSCs were closer to the rabbit inner cell mass (ICM) than rESCs. Furthermore, r iPSCs were capable of colonizing the ICM after aggregation with morulas. Therefore, we propose that r iPSCs self-renew in an intermediate state between naïve and primed pluripotency, which represents a key step toward the generation of *bona fide* naïve PSC lines in rabbits.

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Share Alike License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

Key words: Rabbit model, Embryonic stem cell, Induced pluripotent stem cell, Pluripotency, Cell cycle

## Introduction

Pluripotent stem cells (PSCs) can exist in two morphologically, molecularly and functionally distinct pluripotent states, designated as the naïve and primed states (Nichols and Smith, 2009). The first rabbit pluripotent stem cell (PSC) lines were produced from New Zealand White rabbit blastocysts in the form of embryonic stem cells [rabbit ESCs (rESCs)] (Fang et al., 2006; Wang et al., 2007). In their undifferentiated state, rESCs required both fibroblast growth factor 2 (FGF2) and growth factors of the transforming growth factor (TGF)  $\beta$  family (activin, nodal) for self-renewal (Wang et al., 2008). These results were confirmed in another study, which showed that activin/nodal signaling through Smad2/3 activation was necessary for maintaining the pluripotent status of rESCs (Honda et al.,

2009). These rESCs did not colonize rabbit embryos after being injected into blastocysts (Honda et al., 2008). Honda et al. also established rabbit induced PSC lines [rabbit iPSCs (r iPSCs)] from adult liver and stomach cells (Honda et al., 2010). Similar to rESCs, r iPSCs are dependent on FGF2 for self-renewal. Therefore, rESCs and r iPSCs seemed to exhibit the cardinal feature of primed pluripotency. However, this conclusion should be moderated because none of these studies evaluated these cell lines for other criteria that demarcate naïve and primed pluripotency; moreover, these studies did not compare these cell lines with rabbit inner cell mass (ICM) cells and PSCs from other species. Therefore, the status of rESCs and r iPSCs is yet to be thoroughly evaluated. In our study, we compared rESCs and r iPSCs at both molecular and functional levels and

concluded that (i) rbESCs do not exhibit all the characteristic features of pluripotency and (ii) rbiPSCs exhibit some characteristic features of naïve pluripotency.

## Results

### Derivation of FGF2-dependent rbESC lines

Twenty-four ICMs isolated from 52 blastocysts by immunosurgery were plated on feeder cells in rbESC medium supplemented with FGF2. Twelve of these ICMs could form outgrowths, of which 4 produced a population of highly proliferating cells that could be routinely passaged more than 40 times. These rbESC lines – designated rbES-4, rbES-8, rbES-18 and rbES-19 – formed flattened colonies of compact cells (Fig. 1A; supplementary material Fig. S1A). They were passaged every 3 days after collagenase II treatment of the colonies, followed by gentle dissociation into small clumps. All attempts to passage these cell lines after trypsinization into single-cell suspensions resulted in extensive differentiation and apoptosis (data not shown). All the 4 lines were positive for alkaline phosphatase activity (Fig. 1B; supplementary material Fig. S1A) and were strictly dependent on FGF2 for self-renewal, as determined by their altered morphology after FGF2 withdrawal for 24 h (Fig. 1C). Conventional Giemsa staining showed a normal chromosome number in all the selected lines (>50 metaphase spreads analyzed: 42XY) (Fig. 1D; supplementary material Fig. S1A). For rbES-18 line, the cells were karyotyped using G-banding, and normal chromosome complements were observed in the 4 analyzed metaphase spreads (Fig. 1E). Immunolabeling showed that all the 4 lines expressed *Oct4* in virtually every cell in the respective populations (Fig. 1F; supplementary material Fig. S3). All the 4 cell lines could undergo *in vitro* differentiation into embryoid bodies (EBs) (Fig. 1H). Differentiation was accompanied by the rapid loss of *Nanog* and *Oct4* expression and upregulation of the ectodermal marker *Nestin* and endodermal marker *Hnf3β*. The mesodermal marker *Flk1* was expressed at robust levels in undifferentiated cells (Fig. 1G). All the 4 rbESC lines could induce teratomas after being injected under the kidney capsules in SCID mice. All teratomas contained derivatives of the 3 embryonic germ layers (Fig. 1I,J; supplementary material Fig. S2A). Therefore, these 4 rbESC lines appeared to exhibit the characteristics of PSCs.

### Generation of iPSC lines from adult rabbit fibroblasts

Adult rabbit fibroblasts (rbF) were infected twice at a 48-h interval with a mixture of 4 retroviral vectors that expressed human *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc* transcription factors. Three days after the second infection, the rbFs were dissociated and replated on feeder cells in an rbESC medium supplemented with 10 ng/ml FGF2. The culture medium was changed every day thereafter until some colonies with compact morphologies appeared (Fig. 2A). One hundred and eleven clones were selected between the 15<sup>th</sup> and 29<sup>th</sup> day after fibroblast infection. These 111 clones were passaged by trypsin dissociation into single-cell suspensions. Twelve clones expressing alkaline phosphatase and capable of rapid proliferation were selected for further studies. At passage 6, 4 of these clones expressed rabbit *Nanog* and *Oct4* at the same level as that in rbESCs (Fig. 2B). For 3 clones – designated rbiPS-B19, rbiPS-B24 and rbiPS-B29 – silencing of all the 4 transgenes was achieved at passage 25 (Fig. 2C). Line rbiPS-B25 did not show suppressed *hc-MYC* transgene expression even after 25 passages and was excluded from all subsequent analysis. Withdrawal of FGF2 induced dramatic morphological changes within 48 h, suggesting

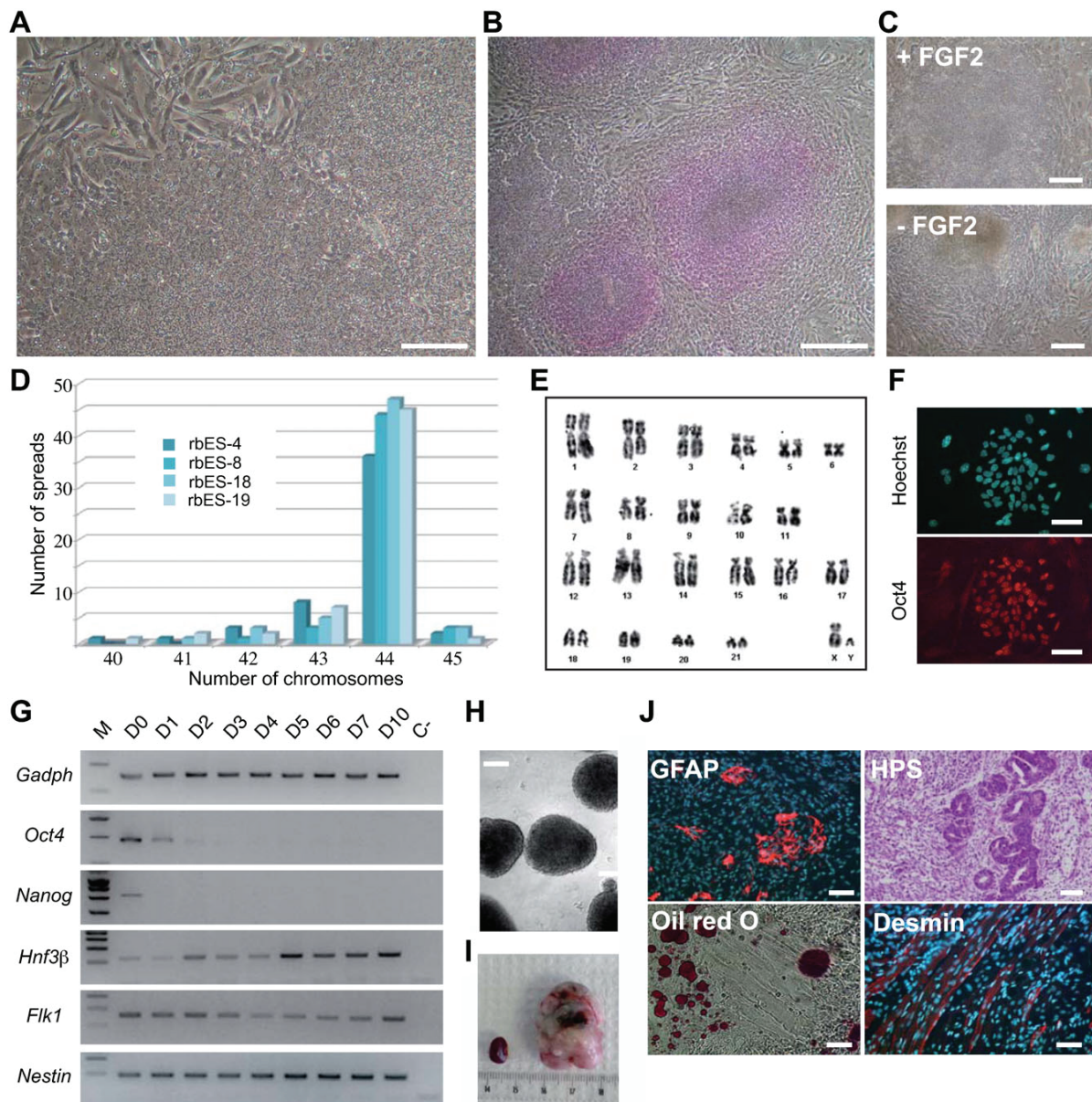
differentiation (Fig. 2D). A normal chromosome number was observed in 2 lines – rbiPS-B19 and rbiPS-B29 (Fig. 2E; supplementary material Fig. S1B). For the rbiPS-B19 cell line, cells were karyotyped using G-banding, and normal chromosome complements were observed in the 20 analyzed metaphase spreads (Fig. 2F). The rbiPS-B24 cell line showed an abnormal 43XX karyotype. Immunolabelling showed that all the 3 cell lines expressed *Oct4* in virtually every cell in the respective populations (Fig. 2G; supplementary material Fig. S3). Differentiation induced by suspension culture resulted in the rapid loss of *Oct4* and *Nanog* expression (Fig. 2H). *HNF3β*, *Flk1* and *Nestin* were already expressed at robust levels in undifferentiated rbiPS-B19 cells. All the 3 lines induced teratomas containing cells that had differentiated into the 3 germ layers after being injected into SCID mice (Fig. 2I; supplementary material Fig. S2B). Most importantly, all iPSC lines could be routinely passaged every 2 days by trypsin dissociation into single-cell suspensions.

### Contrasting expression patterns of stage-specific embryonic antigen (SSEAs) and cadherins

The patterns of stage-specific embryonic antigen (SSEA) expression differed between cell types, and all showed considerable heterogeneity. All the 3 rbiPSC lines showed heterogeneous expression of SSEA1, SSEA4, and TRA-1-60, whereas all the 4 rbESC lines expressed only SSEA1 (supplementary material Fig. S3). Distribution of SSEA1 and SSEA4 expression in various cell populations was quantified using flow cytometry (Fig. 3A). SSEA1 was expressed in 30–60% rbESCs and rbiPSCs, compared with 94% mESCs (Fig. 3B). SSEA4 was expressed in 10–40% rbiPSCs and the pattern was complex with these lines, which comprised 4 cell subpopulations: SSEA1<sup>+</sup> (32–49%), SSEA4<sup>+</sup> (5–12%), double-positive (7–26%), and double-negative (29–37%) cells (Fig. 3C). The distributions between these 4 sub-populations differed between lines and were constant over time in culture (data not shown). We determined whether these 4 populations represented 4 distinct cell types or whether they were capable of converting into each other in culture. To address this each subpopulation was sorted by FACS and subsequently cultured for 1 week (secondary cultures) before analysis by flow cytometry. The heterogeneity originally observed in the unsorted cell population was restored from each subpopulation (Fig. 3C). These results indicate that rbiPSCs existed in 4 interchangeable states (SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>+</sup>, SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>−</sup>, SSEA1<sup>−</sup>/SSEA4<sup>+</sup>, and SSEA1<sup>−</sup>/SSEA4<sup>−</sup>), and that the distribution of the 4 populations was cell line specific.

E-cadherin expression is observed in all PSCs regardless of species, whereas N-cadherin is expressed only in mouse Epiblast Stem Cells (EpiSCs) (Tesar et al., 2007). rbESC and rbiPSC lines had different patterns of E- and N-cadherin expression. Immunolabeling showed that all rbESC lines expressed both E- and N-cadherins similar to rhesus ESCs. In contrast, rbiPSC lines expressed only E-cadherin similar to mouse ESCs (Fig. 3D). Each SSEA subpopulation was sorted by FACS, and the expression of E- and N-cadherins was analyzed by qPCR. All subpopulations of rbiPSCs expressed *Cdh1* (E-cadherin) at levels 10- to 100-fold higher than those measured in rbESCs. In contrast, the same subpopulations expressed *Cdh2* (N-cadherin) at levels 10- to 100-fold lower than those measured in rbESCs (Fig. 3E). Therefore, differential expression of E- and N-cadherins was associated with



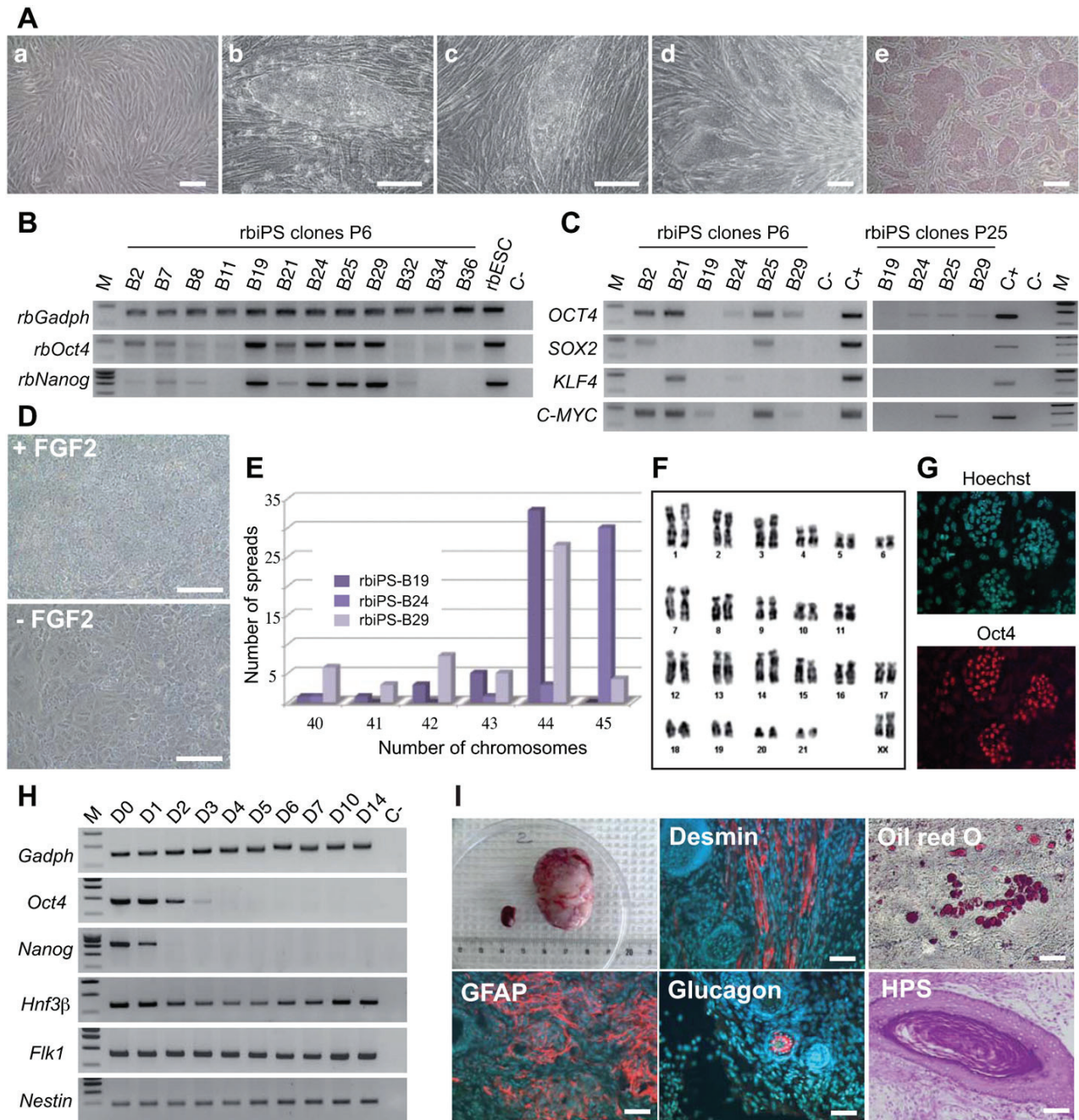


**Fig. 1. Isolation and characterization of rbESC lines.** (A) Phase-contrast image of rbES-18 cells at passage 28 (P28). (B) Alkaline phosphatase activity in rbES-18 cells. (C) Phase-contrast images of rbES-18 cells before and after FGF2 withdrawal for 24 h. (D) Histogram showing the distribution of chromosome numbers in rbES-4 at P13, rbES-8 at P17, rbES-18 at P15, and rbES-19 at P21. (E) G-banding karyotype of the rbES-18 line at P15. (F) Immunolabeling of rabbit Oct4. (G) RT-PCR analysis of pluripotency (*Nanog* and *Oct4*) and germ layer-specific (*Hnf3β*, *Flk1* and *Nestin*) gene expression during differentiation of rbES-18 cells induced by EB formation (days 0–10). (H) EB produced from rbES-18 cells. (I) Teratoma 31 days after injecting rbES-18 cells under the kidney capsule of SCID mice. (J) Histological section of the teratoma with tissue components of all 3 embryonic germ cell layers. Oil red O staining to detect adipocytes. Desmin and GFAP to detect muscle and glial cells, respectively. Gland structures could be identified after HPS staining. Scale bars: 50  $\mu$ m.

the ESC vs iPSC status and not with the cell population heterogeneity observed as the SSEA expression.

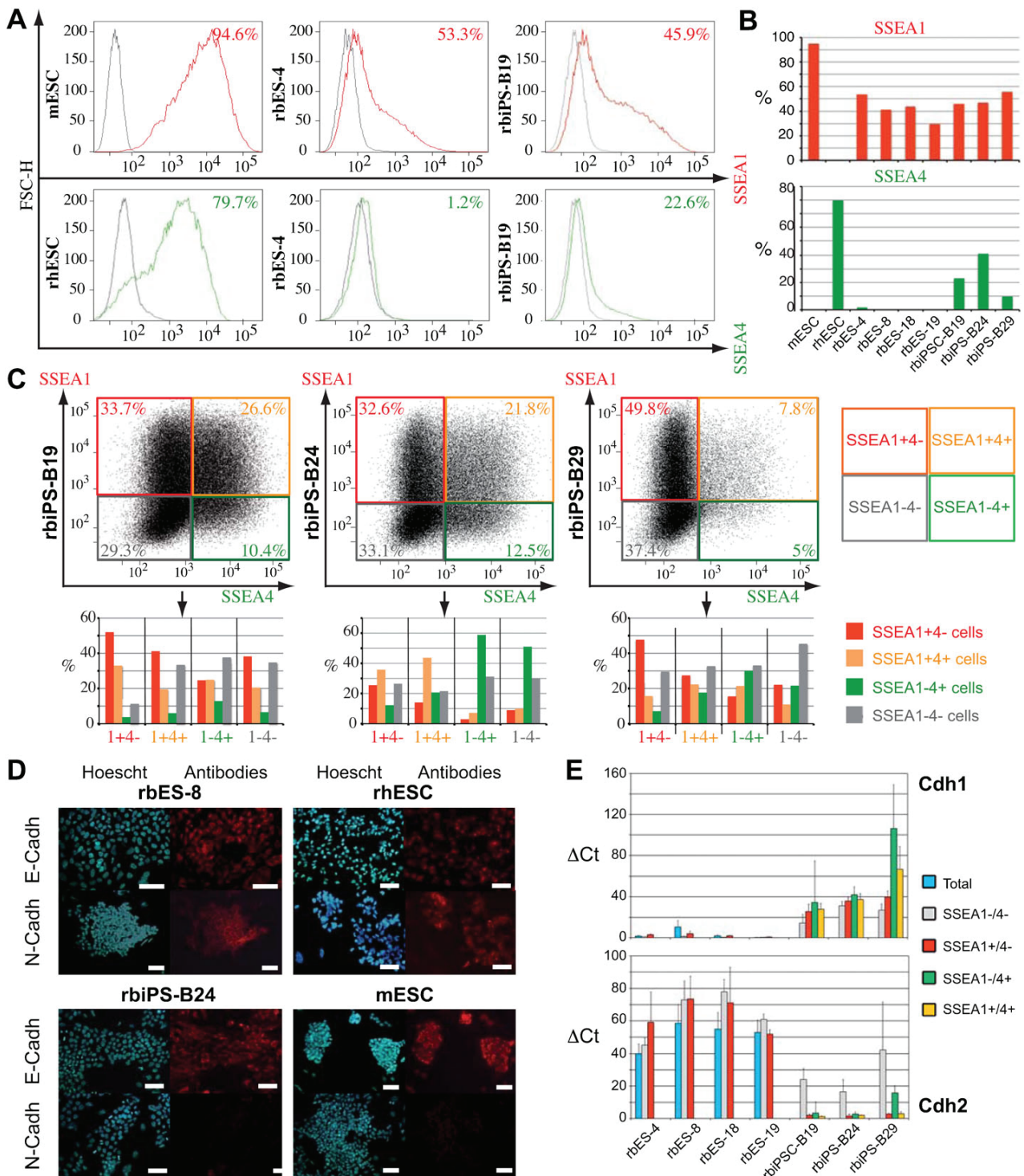
Cell cycle characteristics demarcate the SSEA1<sup>+</sup> rbiPS cells. PSCs show an unusual cell cycle structure that is characterized by a short G1 phase and a high proportion of cells in the S phase. In addition, they do not undergo cell-cycle arrest at the G1

checkpoint in response to DNA damage. Instead, they undergo growth arrest only at the G2 checkpoint (Aladjem et al., 1998; Fluckiger et al., 2006; Filipczyk et al., 2007). Therefore, we investigated whether rabbit PSCs displayed the same cell cycle characteristics. For the 4 rbESC lines, the G1, S, and G2/M phases were observed in  $74 \pm 2.7\%$ ,  $20 \pm 2.8\%$ , and  $6 \pm 2.9\%$  cell populations, respectively. For the 3 rbiPSC lines, the G1, S, and G2/



**Fig. 2. Generation and characterization of rbiPSC lines.** (A) Phase-contrast images of rbiPSCs before (a) and after (b–e) infection with retroviral vectors expressing human transgenes; (b,c) primary colonies (P0) observed after 20 days of infection; (d) colonies observed at P6; (e) alkaline phosphatase activity at P6. (B) Expression of rabbit pluripotent genes *Oct4* and *Nanog* analyzed by RT-PCR in 12 independent rbiPSC clones at P6. (C) Expression of human transgenes analyzed by RT-PCR in 6 independent rbiPSC clones at P6 and P25. (D) Phase-contrast images of rbiPSC-B19 cells before and after FGF2 withdrawal for 48 h. (E) Histogram showing the distribution of chromosome numbers in rbiPSC-B19 at P37, rbiPSC-B24 at P33, and rbiPSC-B29 at P31. (F) G-banding karyotype of rbiPSC-B19 line at P37. (G) Immunolabeling of rabbit Oct4. (H) RT-PCR analysis of pluripotency (*Nanog* and *Oct4*) and germ layer-specific (*Hnf3β*, *Flk1*, and *Nestin*) gene expression during differentiation of rbiPSC-B19 cells induced by EB formation (days 0–14). (I) Teratoma at 30 days after injecting rbiPSC-B19 cells under the kidney capsule of SCID mice, with tissue components of all the 3 embryonic germ cell layers. Histological section stained with HPS shows squamous epithelial cells. Oil red O staining to detect adipocytes. Desmin, GFAP, and glucagon to detect muscle, glial, and pancreatic  $\alpha$ -cells, respectively. Scale bars: 50  $\mu$ m.





**Fig. 3. Expression of SSEA antigens and cadherins.** (A) Flow cytometry analysis of SSEA1 and SSEA4 marker expressions. (B) Histograms showing the percentages of SSEA1<sup>+</sup> and SSEA4<sup>+</sup> cells in various rbESC and rbiPSC lines. (C) Flow cytometry analysis of SSEA1 and SSEA4 marker expression in rbiPSC lines before and after FACS sorting of SSEA subpopulations. Upper panels: Dot plots of SSEA1- and SSEA4-associated fluorescence in rbiPS-B19, rbiPS-B24, and rbiPS-B29 lines before cell sorting. Bottom panels: Histograms showing the percentages of SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>-</sup> (1<sup>+</sup>/4<sup>-</sup> cells), SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>+</sup> (1<sup>+</sup>/4<sup>+</sup> cells), SSEA1<sup>-</sup>/SSEA4<sup>-</sup> (1<sup>-</sup>/4<sup>-</sup> cells), and SSEA1<sup>-</sup>/SSEA4<sup>+</sup> (1<sup>-</sup>/4<sup>+</sup> cells) populations; these cell populations were derived from cultures of rbiPSC lines after sorting each cell population, replating in FGF2-supplemented medium, and subsequent culture for 7 days. (D) Immunolabeling with antibodies for E- and N-cadherins. (E) Histograms showing mRNA levels (ΔCt) of the E-cadherin (*Cdh1*) and N-cadherin (*Cdh2*) as analyzed by qPCR for the entire cell population (total) and in various SSEA subpopulations, as indicated. mRNA levels were normalized to the mRNA level of *Thp*. Scale bars: 50 μm.

M phases were observed in  $43 \pm 2.4\%$ ,  $38 \pm 3.5\%$ , and  $19 \pm 1.9\%$  cell populations, respectively (supplementary material Table S3). Thus, the percentage of rbPSCs in the S phase (20–38%) was higher than that in rbFs (7%) but lower than that in mESCs (68%), mEpiSCs (56%), and rhESCs (41%). The cell cycle distributions of the SSEA1<sup>+</sup> and SSEA4<sup>+</sup> subpopulations were also analyzed. Of all the analyzed cell lines, the SSEA1<sup>+</sup> subpopulations showed the lowest G1 and the highest S fractions than the SSEA1<sup>−</sup> and SSEA4<sup>+</sup> subpopulations. However, no SSEA1<sup>+</sup> subpopulation from any line analyzed showed a cell cycle distribution similar to that observed for SSEA1<sup>+</sup> mESCs (supplementary material Table S3).

To study the cell cycle response of rbPSCs to DNA damage, we analyzed the effects of doxorubicin, a DNA intercalator that induces double-strand breaks (Fig. 4). The G1 fraction of rbFs treated with doxorubicin for 24 h decreased from 80% to 41%, whereas the G2 fraction increased from 12% to 58%, indicating growth arrest in G1 and G2. In contrast, the G1 fraction of doxorubicin-treated mESCs decreased dramatically from 20% to 1%, whereas its G2 fraction increased from 11% to 99%, indicating a lack of G1 checkpoint in mouse PSCs and accumulation of cells at the G2 checkpoint. Similar results were obtained with rhESCs and mEpiSCs for which the G1 and S fractions virtually disappeared after doxorubicin treatment (Fig. 4A). The response of rbPSCs to doxorubicin treatment was more heterogeneous. They all showed moderate decreases in their G1 fractions (rbESCs, from 74% to 70%; rbiPSCs, from 43% to 20%) and significant increase in their G2 fractions (rbESCs, from 6% to 30%; rbiPSCs, from 19% to 80%). We assumed that this might be a reflection of the heterogeneity of rbPSC populations. Therefore, we analyzed the responses of different SSEA fractions to doxorubicin treatment. Only SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>−</sup> and SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>+</sup> subpopulations of rbiPSCs showed complete growth arrest in the G2 phase and did not show cell accumulation in the G1 phase; similar results were observed for mESCs, mEpiSCs, and rhESCs (Fig. 4A,B). All other fractions showed variable accumulation of cells in the G1 and G2 phases, as observed previously in the entire population. Of note, the SSEA1<sup>+</sup> subpopulation of rbESCs still showed accumulation in the G1 and G2 phases after doxorubicin treatment. Thus, these results indicate that only the SSEA1<sup>+</sup> subpopulation of rbiPSCs showed the cell cycle features of mESCs, mEpiSCs, and rhESCs (i.e. a shortened G1 phase, a high proportion of cells in the S phase, and absence of DNA damage checkpoint in G1). Neither the SSEA1<sup>+</sup> subpopulation of rbESCs nor the other subpopulations of rbiPSCs showed the cell cycle features of PSCs.

#### Mouse *Oct4* promoter activity and DNA methylation demarcates rbESC and rbiPSC lines

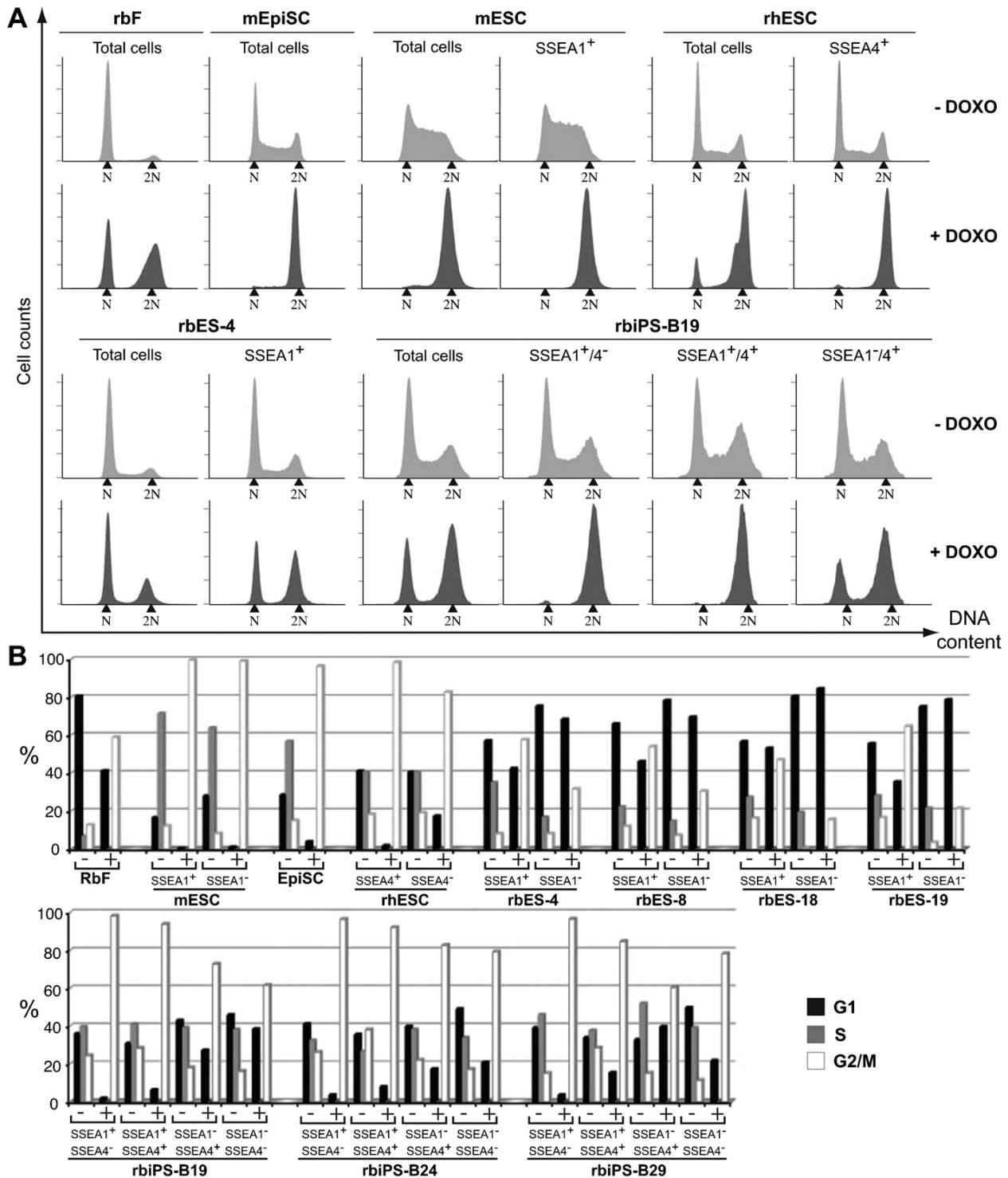
The distal element (DE) of *Oct4* enhancer showed robust activity in ICM cells of mouse blastocyst, primordial germ cells, and mESCs. In contrast, it is minimally active in the epiblast of mouse postimplantation embryo and its EpiSC derivatives (Yeom et al., 1996; Tesar et al., 2007). Thus, DE activity can be used to discriminate between the naïve and primed states of pluripotency (Nichols and Smith, 2009). To evaluate the DE activity in rabbit preimplantation embryos, we used the L-SIN-EOS-C(3)-EiP lentiviral vector (designated EOS) that expressed GFP and the puromycin resistance gene under the transcriptional control of the minimal early transposon promoter and trimer of the CR4 enhancer (Hotta et al., 2009). The CR4 enhancer is a 146-bp

fragment of the mouse DE element that recruits the Oct4, Sox2, and Sp1 transcription factors and recapitulates the regulation of the DE element in pluripotent and differentiated cell lines (Okumura-Nakanishi et al., 2005). A vector expressing GFP from the ubiquitous CAG promoter [GAE-CAG-eGFP/wpre, (Mangeot et al., 2002)] – designated GAE – was used as a control. Both lentiviral vectors were concentrated and injected under the zona pellucida of 8-cell-stage rabbit embryos. The embryos were then cultured to the mid-blastocyst stage before analysis with confocal microscopy. Fluorescent cells were observed in the trophoblast and ICM, with both control and EOS lentivectors, indicating the activity of the trimer of the CR4 enhancer in rabbit preimplantation embryos (Fig. 5A,B). DE activity in the trophoblast cells was consistent with previous observations, indicating that *Oct4* was expressed in the trophoblast of the rabbit blastocyst (Kobolav et al., 2009).

To evaluate the DE activity in rabbit PSCs, rbESC, and rbiPSC lines were infected with EOS and GAE lentivectors and analyzed using flow cytometry after 4 days (Fig. 5C; supplementary material Fig. S4A). All cell lines infected with GAE showed green fluorescence ranging from 12% to 54% of positive cells according to the cell type (threshold set at  $2.5 \times 10^2$ ). Approximately 60–95% of these GFP-positive cells showed fluorescence levels of  $\geq 10^3$ . In contrast, fluorescence levels in EOS-infected cells varied dramatically between cell types. mESCs had the highest level (76% GFP-positive cells had fluorescence levels of  $> 10^3$ ). mEpiSCs showed no expression while rhESCs showed low expression (only 13% GFP-positive cells had fluorescence levels of  $> 10^3$ ). This indicates that rbESCs and iPSCs showed intermediate expression levels (rbES-4, 32%; rbES-8, 33%; rbES-19, 30%; rbiPS-B19, 42%; rbiPS-B24, 41%; and rbiPS-B29, 48%; Fig. 5C; supplementary material Fig. S4A). This suggested that the trimer of the CR4 enhancer was more active in rbPSCs than in mouse EpiSCs and primate ESCs.

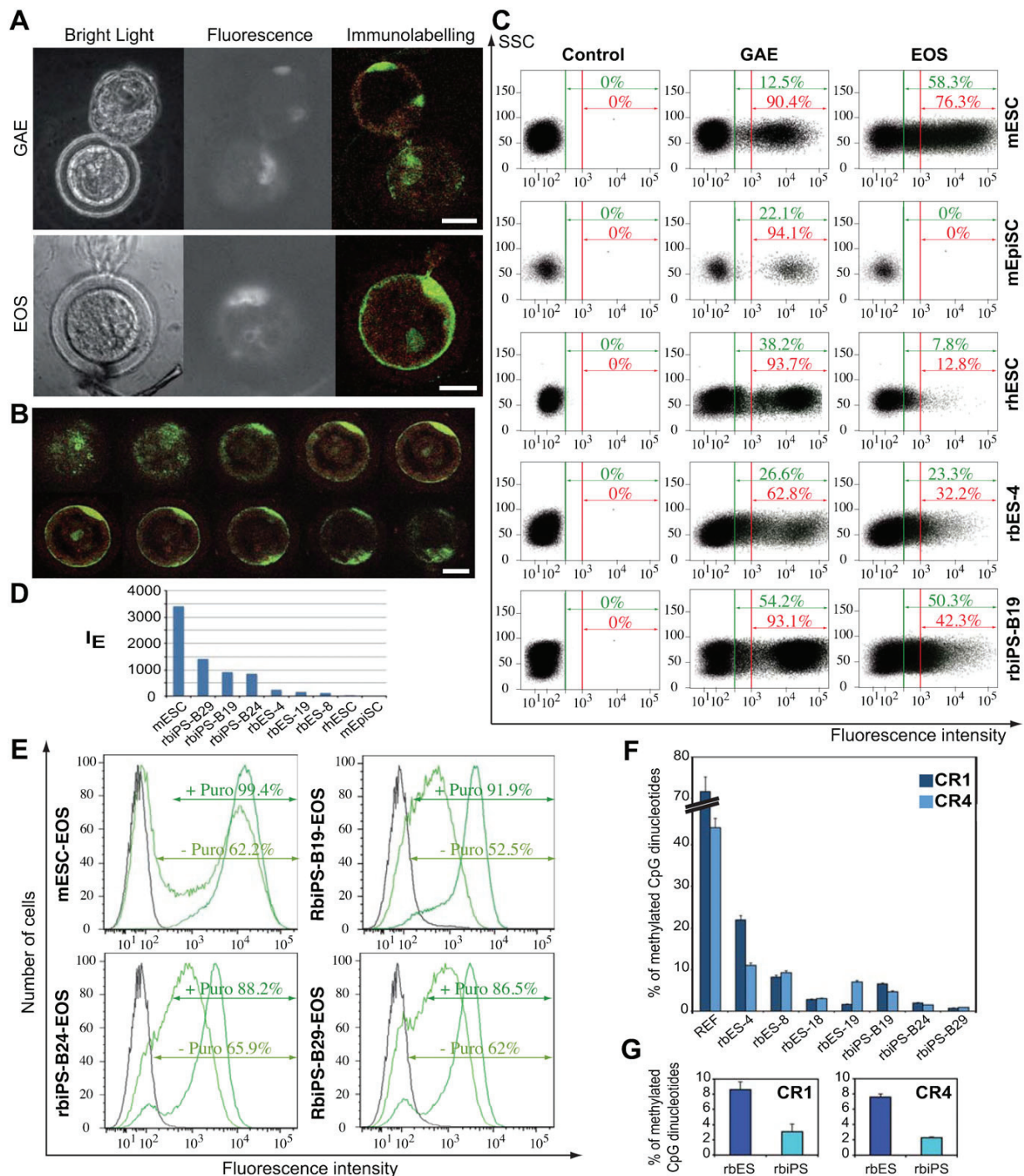
The GFP expression level in EOS-infected cells was influenced by the infection rate. Therefore, to eliminate the confounding effect of the variations in infection rates between the cell lines, we calculated an expression index ( $I_E$ ):  $I_E = \frac{\%GFP^+ \geq 10^3}{\%GFP^+ T} \times \%I_R$ .  $\%GFP^+ \geq 10^3$  is the percentage of GFP<sup>+</sup> cells with expression levels of  $\geq 10^3$ ;  $\%GFP^+ T$  is the percentage of all GFP<sup>+</sup> cells; and  $I_R$  is the percentage of infected cells. Comparison of  $I_E$  values between cell lines showed that mESCs had the highest index, whereas rhESCs and EpiSCs had the lowest index. As determined from previous calculations,  $I_E$  of all rabbit lines was between that of mESCs and rhESCs, with all the 3 iPSCs lines showing higher  $I_E$  indices than the 3 ESC lines (Fig. 5D). From these experiments, we concluded that compared with rbESCs, rbiPSC lines could activate the *mOct4* DE element at a higher level.

This conclusion was strongly reinforced by the results of puromycin selection of EOS-infected cells. All ESC and iPSC lines infected with EOS were cultured for 7 days in a medium supplemented with puromycin. Puromycin-resistant cells could be readily selected and expanded from mESCs and the 3 rbiPSC lines (designated rbiPS-B19-EOS, rbiPS-B24-EOS, and rbiPS-B29-EOS) (Fig. 5E). In contrast, no puromycin-resistant cells could be isolated from any of the rbESC lines infected with the EOS lentivector. Therefore, we concluded that only iPSCs could



**Fig. 4. Cell cycle analysis of rabbit PSCs.** (A) Cell cycle profiles of rBFs, EpiSCs, mESCs, rhESCs, rbES-4, and rbiPS-B19 assessed using flow cytometry after staining with propidium iodide. Cell cycle distributions are shown for the total cell population and different SSEA subpopulations. + DOXO indicates treatment with 50 ng/ml doxorubicin for 24 h. (B) Histograms showing the percentage of cells in the G1, S, and G2/M phases of the cell cycle before and after doxorubicin treatment for different SSEA subpopulations. The percentages were calculated using ModFitLT.





**Fig. 5. Activity and methylation of mouse *Oct4* promoter in rabbit PSCs.** (A) GFP immunolabeling of rabbit mid-stage blastocysts after injecting GAE and EOS lentivectors under the zona pellucida of 8-cell-stage embryos. (B) Serial confocal images of a blastocyst expressing EOS lentivector after GFP immunolabeling and costaining with propidium iodide. (C) Flow cytometry analysis of rbES-4, rbiPS-B19, mESCs, mEpiSCs, and rhESCs 4 days after infection with GAE and EOS lentivectors. For each dot plot, the numbers in green indicate the percentages of all GFP<sup>+</sup> cells. Numbers in red indicate the percentages of GFP<sup>+</sup> cells that had a fluorescence level of  $\geq 10^3$  and which were normalized to the percentage of all GFP<sup>+</sup> cells. (D) Histogram showing the results for GFP expression index:  $I_E = \frac{\%GFP^{+ \geq 10^3}}{\%GFP^{+ T}} \times \%I_R$ . (E) Flow cytometry analysis of mESC-EOS, rbiPS-B19-EOS, rbiPS-B24-EOS, and rbiPS-B29-EOS before (– Puro) and after (+ Puro) selection with puromycin for 14 days. (F) Histogram showing the percentages of methylated CpG dinucleotides evaluated after bisulfite genomic sequencing of the *Oct4* promoter regions (CR1 and CR4) in all rabbit PSC lines and REFs. (G) Histogram comparing the percentages of methylated CpG dinucleotides between rbESCs and rbiPSCs in CR1 or CR4 region. Statistical analyses were conducted using analysis of variance followed by Fisher's test. Differences were considered significant for  $P < 0.01$ . Scale bars: 50  $\mu$ m.

activate the trimer of the CR4 enhancer at a level sufficient to confer resistance to puromycin. This conclusion was supported by the observation that the mean intensity of GFP fluorescence increased during puromycin selection of iPSCs infected with EOS, suggesting that only some rare cells expressing GFP at high levels were resistant to puromycin and expanded during selection. These puromycin-resistant cells had notably higher percentages of SSEA1<sup>+</sup> and SSEA4<sup>+</sup> cells than the original cells (i.e. before puromycin selection) (supplementary material Fig. S4B).

Regions CR1 and CR4 were chosen for the methylation study. Bisulfite genomic sequencing showed that both regions were 3–10 times more methylated in rabbit embryonic fibroblasts (REFs) than in rabbit PSCs (Fig. 5F; supplementary material Fig. S5). Regions CR1 and CR4 were less methylated in rbiPSCs than in rbESCs [CR1: 3.1% methylated CpG dinucleotides in rbiPSCs vs 8.6% in rbESCs ( $P < 0.01$ ); CR4: 2.3% methylated CpG dinucleotides in rbiPSCs vs 7.6% in rbESCs ( $P < 0.001$ )] (Fig. 5G; supplementary material Fig. S5).

**Gene expression profiling demarcates rbESC and rbiPSC lines**  
To further define the molecular properties of rbESCs and rbiPSCs, we purified the SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>−</sup>, SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>+</sup>, and SSEA1<sup>−</sup>/SSEA4<sup>−</sup> subpopulations by FACS sorting in 4 rbESC lines and 2 rbiPSC lines and performed a global analysis of their expression profiles. For this, we used a rabbit-specific gene expression microarray containing approximately 13,000 independent genes. For each cell line (rbES-4, rbES-8, rbES-18, and rbES-19; rbiPS-B19 and rbiPS-B29) and SSEA subpopulations, 3 biological replicates were hybridized to the customized rabbit array. Hierarchical clustering of the normalized data showed that all subpopulations of rbESC lines were clustered on one side and all subpopulations of rbiPSC lines were clustered together on the other (Fig. 6A). This indicates that despite the heterogeneity observed in the cell lines, the variability is mainly associated with the cell status (rbESC vs rbiPSC) and not with the SSEA expression status.

To further examine the transcriptome of various rbESC and rbiPSC subpopulations, we examined the expression of rabbit homologs of 22 mouse genes [*Blimp1*, *Cdx2*, *Cdh1* (*E-cadherin*), *Cdh2* (*N-cadherin*), *Cldn6*, *Dax1* (*NrOb1*), *Dazl*, *Essrb*, *Fbxo15*, *Fgf4*, *Gbx2*, *Klf4*, *Lefty2*, *Nanog*, *Oct4* (*Pou5f1*), *Otx2*, *Pecam1*, *Pitx2*, *Piwi2*, *Rex1* (*Zfp42*), *Tbx3*, and *Tcfcp2l1*], the mRNA levels of which have been used to evaluate stemness and demarcate the naïve and primed pluripotent states in rodent cells (Tesar et al., 2007; Bao et al., 2009; Hanna et al., 2010; Tang et al., 2010; Wang et al., 2012). Of note, 12 genes (*Klf4*, *Cldn6*, *Otx2*, *Nanog*, *Oct4*, *Cdx2*, *Dazl*, *Rex1*, *Fbxo15*, *Pitx2*, *Tbx3*, and *Gbx2*) were represented on the microarray. The expression levels of these 22 genes were determined by qPCR for the SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>−</sup>, SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>+</sup>, SSEA1<sup>−</sup>/SSEA4<sup>+</sup>, and SSEA1<sup>−</sup>/SSEA4<sup>−</sup> subpopulations purified from the 4 rbESC and 3 rbiPSC lines (supplementary material Table S4; Fig. S6; Fig. 3E). In agreement with the microarray data, correlation clustering of the  $\Delta$ Ct values showed that the rbiPSC subpopulations showed fewer differences between them than with the rbESC subpopulations (Fig. 6B). To determine which genes accounted for the variations between rbESCs and rbiPSCs, PCA was performed from the qPCR data obtained with the SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>−</sup> and SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>+</sup> subpopulations (Fig. 6C). The first 2 principal components had 78% of the total variation. The first axis that

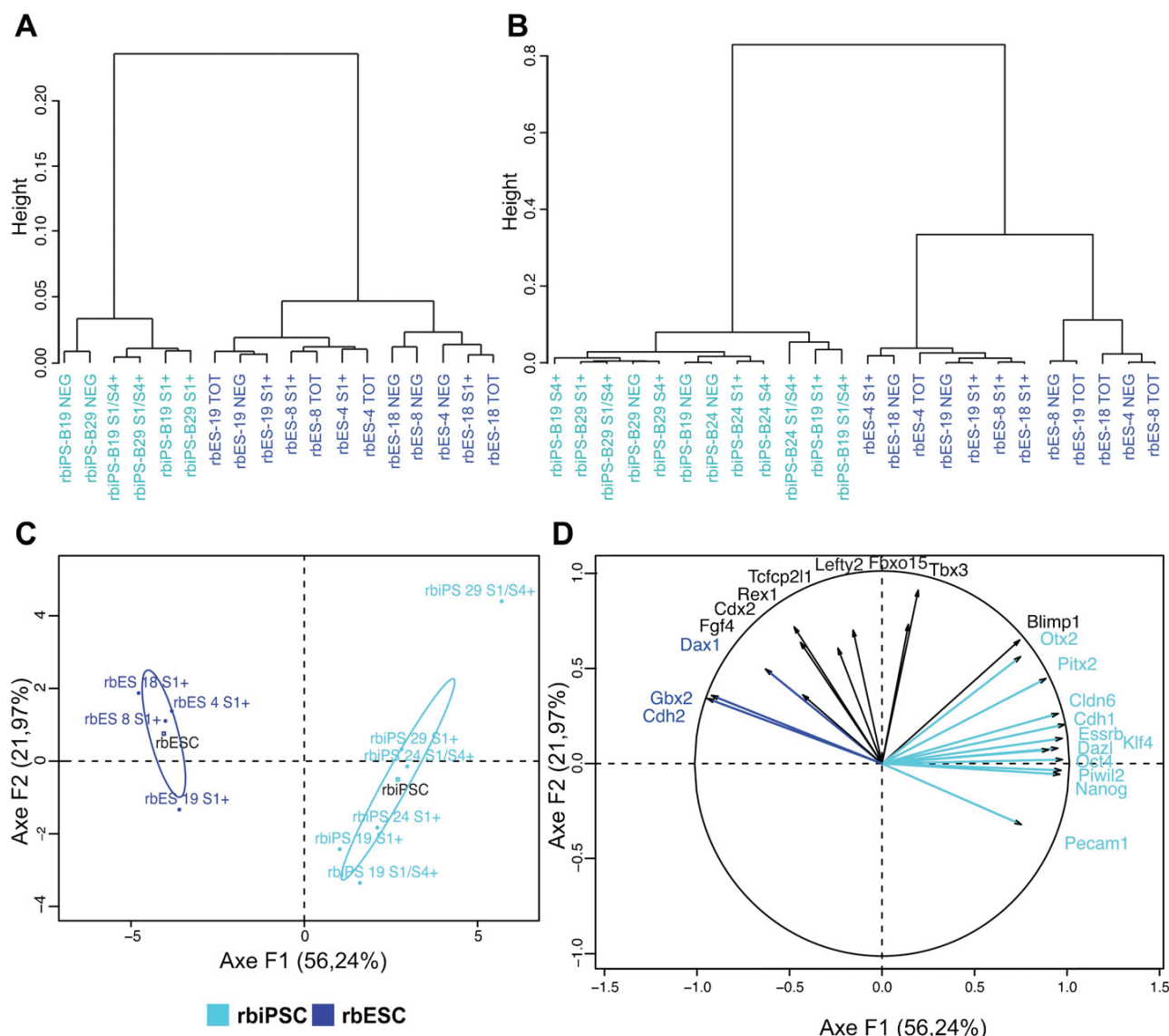
represented 56% of the total variability distinguished between rbESC and rbiPSC lines in accordance with correlation clustering analysis. The second axis represented 22% of the total variability and accounted for variability between cell lines. A graphical representation of gene dispersion in a trigonometric circle highlighted 2 clusters of genes: the first comprised *Cdh2*, *Gbx2*, and *Dax1* and the second comprised *Otx2*, *Pitx2*, *Cldn6*, *Cdh1*, *Essrb*, *Klf4*, *Dazl*, *Oct4*, *Piwi2*, *Nanog*, and *Pecam1* (Fig. 6D). Both clusters were clearly anticorrelated over the cell lines, indicating that their relative expression levels were mutually exclusive. Both clusters appeared to be representative because most of the distances between the origin and the projected variables were globally close to the maximum distance (i.e. 1). Thus, these 14 genes explained most of the variability observed between rbESCs and rbiPSCs (first axis in Fig. 6C). The other 8 genes (*Fgf4*, *Cdx2*, *Rex1*, *Tcfcp2l1*, *Lefty2*, *Fbxo15*, *Tbx3*, and *Blimp1*) mostly accounted for the variability observed between lines in each group (2<sup>nd</sup> axis Fig. 6D).

#### rbiPSCs are closer to ICM cells

We next examined which cell types (rbESCs vs. rbiPSCs) and which subpopulations (SSEA1<sup>+</sup> vs. SSEA4<sup>+</sup> vs. SSEA<sup>−</sup>) showed the closest proximity to ICM cells of the rabbit embryo. To this end, the expression of the 22 genes was measured in the ICM of third-day rabbit mid-blastocysts (supplementary material Table S4) and compared to the expression measured in the rbESC and rbiPSC subpopulations. Calculation of the Euclidean distances between the ICM sample and each subpopulations showed that SSEA1<sup>+</sup> rbiPSCs were the closest to the ICM and the SSEA1<sup>−</sup> rbiPSCs were the farthest (Fig. 7A). Interestingly, all rbESC subpopulations, irrespective of their SSEA1 status, were more distantly related to the ICM than the SSEA1<sup>+</sup> rbiPSCs. The relative proximity of the SSEA1<sup>+</sup> rbiPSCs with the ICM could be further evidenced in a rank histogram of the relative expression level of the 22 genes (Fig. 7B,C). The RNA level of each gene in ICM cells were normalized to the mRNA level of *Tbp*, and the resultant  $\Delta$ Ct was ranked from the highest (*Oct4*:  $\Delta$ Ct=37.5) to the lowest (*Dax1*:  $\Delta$ Ct=0.0013). Most genes that were strongly expressed in rbiPSCs than in rbESCs (*Oct4*, *Cdh1*, *Essrb*, *Cldn6*, *Nanog*, *Klf4*, *Otx2*, *Dazl*, *Pitx2*, *Piwi2*, *Pecam1*;  $P < 0.05$ ) were highly expressed in the ICM ( $\Delta$ Ct>1). In contrast, genes that were strongly expressed in rbESCs (*Cdh2*, *Gbx2*, *Dax1*;  $P < 0.05$ ) were expressed at low levels in the ICM ( $\Delta$ Ct<0.1). Taken together, these results indicate that the gene expression profile of SSEA1<sup>+</sup> rbiPSCs best matched that of the ICM cells of rabbit preimplantation embryo.

#### Colonization of pre-implantation embryos by rbESCs and rbiPSCs

To evaluate the capacity of rbESCs to colonize pre-implantation embryos and contribute to the formation of ICM, 5–10 rbES-18 cells that expressed GFP were injected under the zona pellucida of 20 eight-cell-stage rabbit embryos. Of note rbES18 was derived from a GFP transgenic embryo (Al-Gubory and Houdebine, 2006) and GFP was expressed by all cells in this population (Fig. 8A). In a parallel experiment, rbES-18 SSEA1<sup>+</sup> cells were sorted by FACS and then injected into 67 eight-cell-stage embryos. All embryos were cultured until they reached the mid-blastocyst stage prior to GFP immunostaining and analysis by confocal microscopy (supplementary material Table S5; Fig. 8B). No GFP-expressing cells were observed in the 74



**Fig. 6. Gene expression analysis for rbESCs and rbiPSCs.** (A) Hierarchical clustering of transcriptome data (mean values/cell category) using Pearson correlation coefficient as a measure of distance between samples. (B) Correlation clustering for SSEA subpopulations of rbESCs and rbiPSCs (S1<sup>+</sup>: SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>-</sup>; S4<sup>+</sup>: SSEA1<sup>-</sup>/SSEA4<sup>+</sup>; S1/S4<sup>+</sup>: SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>+</sup>; NEG: SSEA1<sup>-</sup>/SSEA4<sup>-</sup>; TOT: total population) based on the RNA levels of the 22 genes (*Blimp1*, *Cdx2*, *Cdh1*, *Cdh2*, *Cldn6*, *Dax1*, *Dazl*, *Essrb*, *Fbxo15*, *Fgf4*, *Gbx2*, *Klf4*, *Lefty2*, *Nanog*, *Oct4*, *Otx2*, *Pecam1*, *Pitx2*, *Piwil2*, *Rex1*, *Tbx3*, and *Tcfcp2l1*) measured by qPCR. mRNA levels were measured in 3 biological replicates and 3 technical repeats, and normalized to *Tbp* expression levels. (C) Graphical representation of the first principal component of PCA for SSEA1<sup>+</sup>(S1<sup>+</sup>) and SSEA1<sup>+</sup>/SSEA4<sup>+</sup>(S1/S4<sup>+</sup>) subpopulations based on the RNA levels of the 22 genes that discriminated the 2 groups of relatively closer cell types. (D) Graphical representation of the first principal component of PCA for the 22 genes in a trigonometric circle that discriminated the 2 groups of anticorrelated genes (shown in dark blue and cyan).

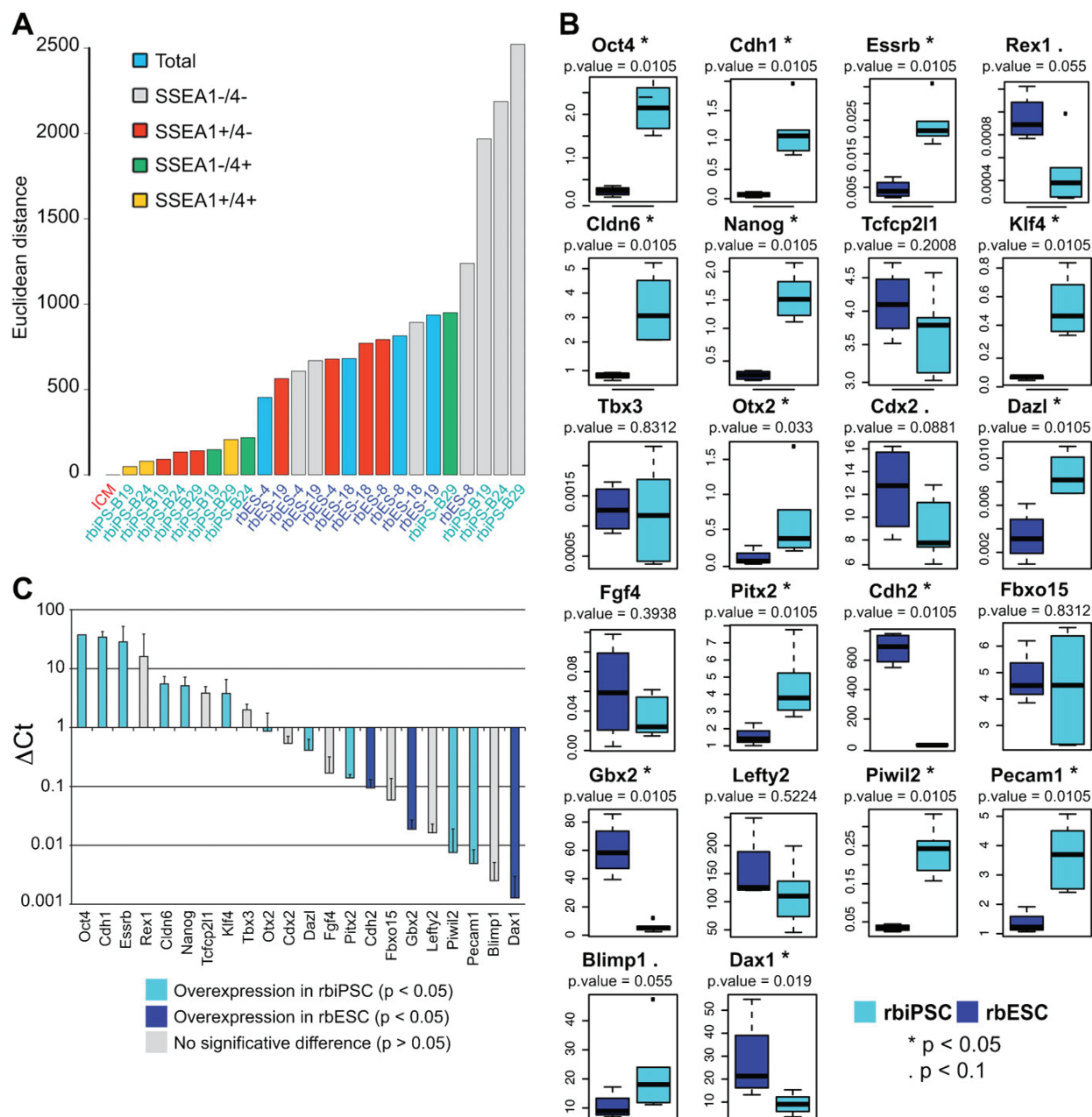
embryos that had successfully developed to the blastocyst stage. In contrast, when 5–10 mES GFP<sup>+</sup> cells (line CGR8-GFP) were injected into rabbit embryos at the same stage, all the resulting blastocysts (15) exhibited extensive colonization of ICM (Fig. 8C). Thus, rabbit early-cleavage-stage embryos were permissive to colonization by naïve mESCs but not by rbESCs.

We performed a similar experiment with rbiPS-B19 line. First, rbiPS-B19 cells were infected with the GAE lentivector that expressed GFP under the CAG promoter. GFP<sup>+</sup> cells were sorted by FACS and then injected into 47 eight-cell-stage rabbit

embryos. All developed to the blastocyst stage, but only one embryo exhibited GFP<sup>+</sup> cells in the ICM and in the trophoblast. Similarly, SSEA1<sup>+</sup> rbiPS-B19-GFP cells were sorted prior to injection into 65 eight-cell-stage embryos. Only one blastocyst had GFP<sup>+</sup> cells in the ICM after GFP immunostaining (Fig. 8D).

We thought that isolated rbiPSC survival would be very poor after injecting them into eight-cell-stage embryos and that this could explain the low rate of chimaeric blastocysts that was observed. To bypass the dissociation step, we generated aggregation chimaeras with 8-cell-stage embryos. Of note, this

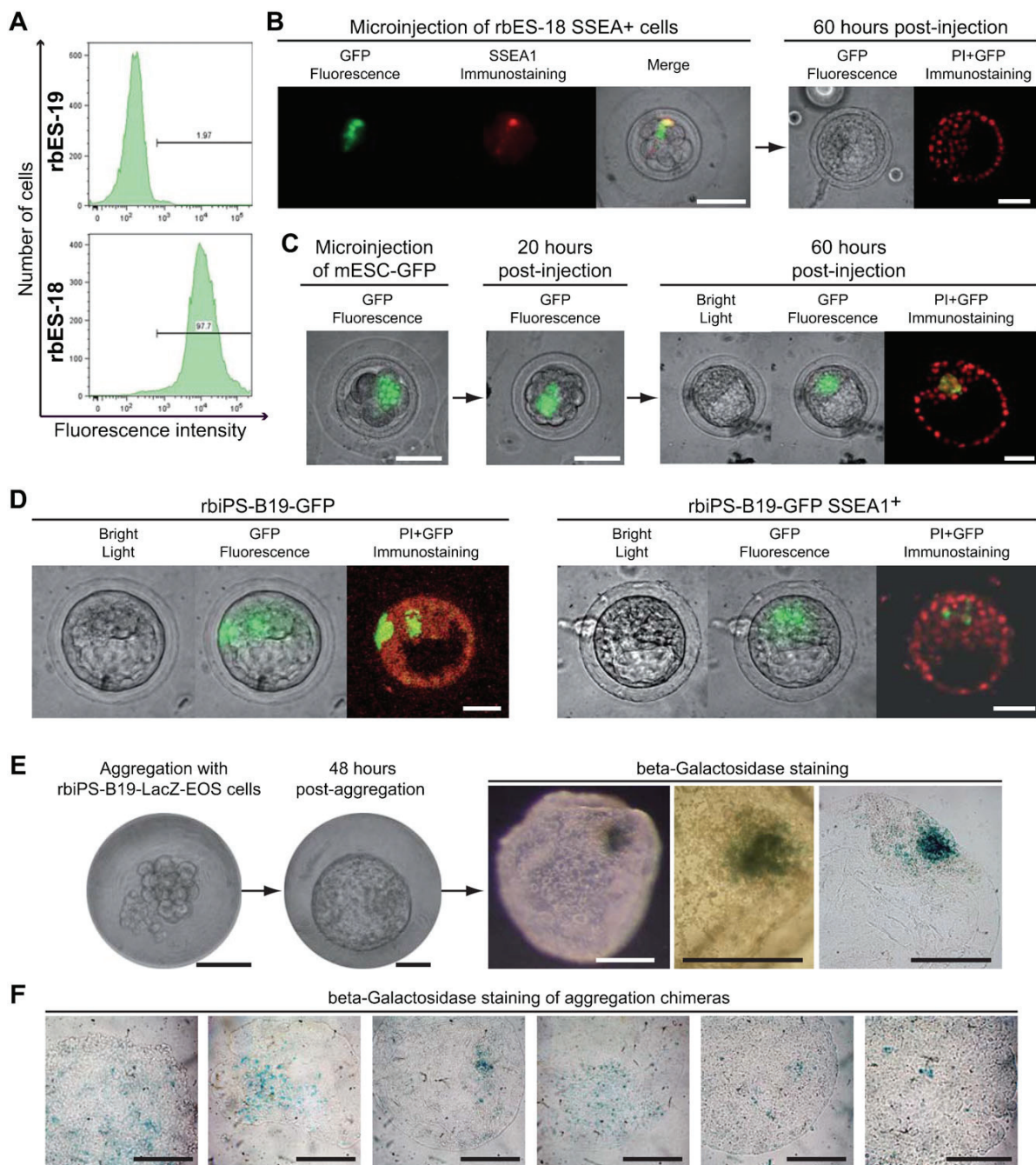




**Fig. 7. Gene expression profiling in rbESCs and rbiPSC vs. ICM cells.** (A) Histogram showing the Euclidean distances between the ICM cells and each subpopulation, as determined from the expression profiles of the 22 genes. Euclidean distances correspond to the value of a vectorial distance in a multidimensional orthonormal basis (the number of dimensions is the number of genes analyzed). An Euclidean distance  $D$  for a PSC subpopulation  $a$  was calculated using the following formula:  $D = \sqrt{(x_a - 1)^2 + (y_a - 1)^2 + \dots + (n_a - 1)^2}$  (1).  $x_a$ ,  $y_a$ , and  $n_a$  represent the relative expression of each gene ( $x$ ,  $y$ , and  $n$ ) calculated by qPCR for the PSC subpopulation line  $a$ . (B) Histogram showing the  $\Delta C_t$  values calculated for each of the 22 genes in the SSEA1<sup>+</sup> rbESCs (dark blue bars) and SSEA1<sup>+</sup> rbiPSCs (cyan bars). (C) Histogram showing the  $\Delta C_t$  values calculated for each of the 22 genes in the rabbit ICM, normalized to the mRNA level of *Thp* gene ( $\Delta C_t = 1$ ) and ranked from the highest (left) to the lowest (right). Cyan bars: genes highly expressed in rbiPSCs, as calculated in panel B; dark blue bars: genes highly expressed in rbESCs; grey bars: genes equally expressed in rbiPSCs and rbESCs.

technique requires removal of the mucous coat, which prevents embryo implantation into the uterus after transfer to surrogates (Murakami and Imai, 1996). For this goal, rbiPS-B19 cells were infected with ABP-RP-TLCLACZL, a lentiviral vector that expressed the lacZ gene under the control of the EF1 $\alpha$

promoter. Viable  $\beta$ -galactosidase<sup>+</sup> cells were isolated by iterative FACS sorting until a population of rbiPS-B19 cells that expressed  $\beta$ -galactosidase at a robust level could be stably expanded. The rbiPSC-B19-LacZ cells were subsequently infected with the EOS lentivector and selected with puromycin



**Fig. 8. Colonization of pre-implantation embryos.** (A) Flow cytometry analysis of GFP expression in rbES-18 and rbES-19 cells derived from GFP-transgenic and non-transgenic blastocysts, respectively. (B) Microinjection of SSEA1<sup>+</sup> rbES-18 cells into eight-cell-stage embryos and observation of developing embryos at the blastocyst stage. (C) Microinjection of mESCs (CGR8-GFP line) into rabbit eight-cell-stage embryos and observation of developing embryos at morula and blastocyst stages. (D) Observation of blastocyst-stage embryos resulting from the microinjection of rbiPS-B19-GFP and rbiPS-B19-GFP SSEA1<sup>+</sup> cells into eight-cell-stage embryos. (E) Left panels: Phase-contrast images showing aggregation of an eight-cell-stage embryo with a clump of rbiPS-B19-LacZ-EOS cells, and the resulting blastocyst after *in vitro* culture for 48 hours. Right panels:  $\beta$ -galactosidase activity in the ICM of the blastocyst. (F)  $\beta$ -galactosidase activity in blastocysts resulting from aggregation of eight-cell-stage embryos with a clump of rbiPS-B19-LacZ-EOS cells and subsequent *in vitro* culture for 48 hours. Scale bars: 50  $\mu$ m.

to generate a homogenous population of *mOct4* DE-positive cells (not shown). Clumps of 20–25 resulting rbiPSC-B19-LacZ-EOS cells were aggregated in the zona pellucida- and mucous

coat-free 8-cell-stage embryos and were subsequently cultured to the mid-blastocyst stage. We obtained 62 blastocysts, of which 10 had  $\beta$ -galactosidase<sup>+</sup> cells in the ICM. In one case, the ICM

was heavily colonized by  $\beta$ -galactosidase<sup>+</sup> cells (Fig. 8E,F; supplementary material Table S5).

## Discussion

Using the molecular and functional criteria that characterize pluripotency in rodents and primates, we demonstrated that rbESCs and rbiPSCs show some key differences. First, similar to mESCs, rbiPSCs are resistant to trypsinization to single-cell suspensions, a procedure that induces extensive cell death and differentiation when applied to rbESCs, mouse EpiSCs (Tesar et al., 2007), and primate ESCs (Wianny et al., 2008). Second, similar to mESCs, rbiPSCs express elevated levels of E-cadherin, whereas rbESCs express both E- and N-cadherins similar to mouse EpiSCs and primate ESCs (Tesar et al., 2007; Hawkins et al., 2012). Third, the cell cycle of rbESCs had a longer G1 phase than the S and G2 phases and similar to somatic cells, they undergo growth arrest in the G1 phase after DNA damage. This is in sharp contrast to the SSEA1<sup>+</sup> rbiPSCs as well as to all mouse and primate PSCs examined until date, which have a relatively short G1 phase and lack a DNA damage checkpoint in the G1 phase (Aladjem et al., 1998; Hong and Stambrook, 2004; Fluckiger et al., 2006; Filipczyk et al., 2007; Momcilovic et al., 2010). Fourth, the CR4 element of the mouse *Oct4* DE exhibits a more robust activity in rbiPSCs than in rbESCs. High CR4 element activity is observed in mESCs, whereas low activity is observed in mouse EpiSCs (Tesar et al., 2007). Fifth, the *Oct4* promoter is less methylated in the rbiPSCs than in the rbESCs. Sixth, rbESCs and rbiPSCs show distinct gene expression profiles. We identified 14 genes whose activity is different between rbiPSCs and rbESCs. Similar to that in mESCs, *Essrb*, *Klf4*, *Piwi2*, *Cdh1*, *Dazl*, and *Pecam1* are strongly expressed in rbiPSCs; however, they are expressed at low levels in rbESCs. Last, based on the expression of the 22 selected genes, rbiPSC lines are the closest to rabbit ICM, whereas the profiles of all rbESC lines are the farthest. Taken together, it can be concluded that rbiPSCs show many characteristic features of naïve pluripotency as defined in rodents, i.e. resistance to single-cell dissociation, no expression of N-cadherin, robust activity of the distal enhancer of mouse *Oct4*, and robust expression of ICM-specific markers. However, rbiPSCs do not show all the attributes of naïve pluripotency. For instance, they exploit FGF2 signaling for self-renewal, an attribute of primed pluripotency (Nichols and Smith, 2009). In addition, they do not express all the molecular markers of naïve pluripotency, including *Rex1*, *Tbx3*, *Gbx2*, *Fgf4*, and *Dax1* (Tesar et al., 2007). Furthermore, they show a reduced capacity to colonize the ICM after injection into rabbit blastocysts. Based on these observations, we propose that rbiPSCs self-renew in an intermediate state between naïve and primed pluripotency. Such an intermediate state may resemble the intermediate epiblast stem cells (IESCs) recently described in the mouse (Chang and Li, 2013). Like IESCs, rbiPSCs express *Rex1* (naïve pluripotency marker) and *Otx2* (primed pluripotency marker) at low levels, and express *Pecam1* (naïve pluripotency marker) and *Pitx2* (primed pluripotency marker) at high levels. Moreover, both rbiPSCs and IESCs can colonize the ICM after aggregation with morulas. In the case of IESCs, the IESC-derived ICM cells failed to contribute to post-implantation development. In the case of rbiPSCs, we could not address this question because the morula aggregation technique requires removal of the mucin coat, which prevents embryo implantation into the uterus after transfer to surrogates (Murakami and Imai, 1996).

However, the growth requirements of IESCs and rbiPSCs seem different. IESCs, which grow on gelatin, respond either to LIF or to activin to self-renew in the undifferentiated state. By contrast rbiPSCs grow on feeders and are strictly dependent on FGF2 signalling. Nevertheless, the possibility remains that rbiPSCs could also be dependent on LIF produced by feeder cells.

We have shown that rbESCs do not show all the attributes of pluripotent stem cells. In particular, they have a DNA damage checkpoint in the G1 phase like somatic cells. It is generally assumed that shortening the G1 phase sustains the pluripotent state by restricting the window of opportunity for differentiation cues (Mummery et al., 1987; Burdon et al., 2002; Sela et al., 2012; Coronado et al., 2013). In *bona fide* pluripotent stem cells, the lack of a DNA damage checkpoint in G1 might further reduce this window by preventing growth arrest at a critical point for self-renewal. Thus, rbESCs lack some key features of the pluripotent cell cycle, which might explain why they exhibit such a low proliferation rate and high spontaneous differentiation rate than rbiPSCs and primate ESCs.

To conclude, we have reported the first PSC lines in a non-rodent species that show characteristics of naïve pluripotency. These cells represent a first step towards genome engineering and production of germline chimeras in rabbits.

## Materials and Methods

### Rabbit breeding

Sexually mature New Zealand White rabbits were purchased from Hycote (Marcoing, France) or HyPharm (Roussay, France). Superovulations of females were induced as described previously (Salveti et al., 2010). Sixty hours after artificial insemination, the fertilized embryos were flushed from explanted oviducts using Euroflush® (IMV Technologies) and cultured in TCM199 medium (Sigma) supplemented with 10% new-born calf serum (Sigma) at 38°C in 5% CO<sub>2</sub>.

### Cell culture

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared from 12.5-day-old embryos from the OF1 strain (Charles River). Rabbit embryonic fibroblasts (REFs) were prepared from 12-day-old embryos from the New Zealand White (Hycote). Rabbit fibroblasts (rbFs) were prepared from the ear skin of a 5-month-old New Zealand White female. MEFs, REFs, rbFs, the 293T cell line (ATCC, CRL 11268), the rhesus monkey ESC (rhesus) line LyonES (Wianny et al., 2008), and mouse ESCs [mESCs, CGR8 line (Mountford et al., 1994)] were cultured as described elsewhere (Sandrin et al., 2002; Wianny et al., 2008; Savatier et al., 1996). EpiSCs were derived from epiblasts of 6.5-day-old mouse embryos of the OF1 strain and cultured as described previously (Brons et al., 2007). rbESCs and rbiPSCs were cultured on mitomycin C-treated MEFs ( $1.25 \times 10^4$  MEF/cm<sup>2</sup>) in DMEM/F12 medium supplemented with 20% knockout serum replacement, 1% non-essential amino acids and 1% of a solution of 10,000 U/ml penicillin + 10,000 U/ml streptomycin + 29.2 mg/ml L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 100  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Invitrogen). For rbESC and rbiPSCs culture, the medium was supplemented with 13 ng/ml or 10 ng/ml FGF2, respectively. rbiPSCs were routinely dissociated into single-cell suspensions after treatment with 0.05% trypsin-EDTA. rbESCs were dissociated into small clumps of cells after treatment with 1 mg/ml collagenase II (Sigma).

### Immunosurgery

The mucin coat and the zona pellucida of rabbit blastocysts (70 to 72 h post-insemination; mid-blastocyst stage) were mechanically removed after brief exposure (2 min) to 5 mg/ml pronase (Sigma). ICMs were separated from the trophectoderm by immunosurgery after incubation of hatched blastocysts in anti-rabbit whole goat serum (Sigma) at 37°C for 30 min and brief exposure (5 min) to guinea pig complement serum (Sigma). Isolated ICMs were transferred to four-well plates on mitomycin C-treated MEFs at a concentration of  $3.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in rbESC medium. After 5 to 6 days, the developing outgrowths were mechanically dissociated into small clumps and transferred onto fresh feeder cells at  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. All subsequent passages were performed by mechanical dissociation after treating colonies with collagenase II at 1 mg/ml, followed by plating cell clumps on feeder cells at a concentration of  $1.25 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>.

### Virus production and cell infection

Plasmids used for producing retroviral and lentiviral vectors were either purchased from Addgene [pMXs-hOCT3/4 (17217), pMXs-hSOX2 (17218), pMXs-hKLF4



(17219), pMXs-hc-MYC (17220) (Takahashi et al., 2007) and pL-SIN-EOS-C(3+)-EiP (21313) (Hotta et al., 2009)] or obtained from Dr Cosset [pTG5349, pHCMV-GP and pGAE-CAG-eGFP/wpre (Sandrin et al., 2002; Mangeot et al., 2002)] or Dr Suter [pSPax2 and pMD2G (Suter et al., 2006)]. Virus production, concentration and titration were performed as previously described by transfection of 293T cells (Sandrin et al., 2002). Concentrated LacZ-expressing lentiviral particles were purchased from Allele Biotech (ABP-RP-TLCLACZL).

To generate rbiPSCs,  $5 \times 10^5$  rBFs were infected twice at a two-day interval with  $3 \times 10^6$  of viral particles, which contained equal parts of the four freshly produced hOct4, hSox2, hKlf4 and hMyo retroviruses [multiplicity of infection (m.o.i.)=8], in the presence of 4 µg/ml polybrene (Sigma). Three days after the second infection, rBFs were trypsinized into single cells and replated at low density ( $6 \times 10^2$  cells/cm<sup>2</sup>) onto growth-inactivated MEFs in rbiPSC medium. The medium was changed every other day for 2 to 3 weeks until iPSC-like colonies appeared. To infect ESCs and iPSCs, the cells were plated on Matrigel (Beckton Dickinson) prior to infection with L-SIN-EOS-C(3+)-EiP and GAE-CAG-eGFP/wpre lentivectors at an m.o.i. of 5–10 in appropriate media supplemented with 6 µg/ml of polybrene. Rabbit eight-cell-stage embryos were infected by microinjection of 1 nl L-SIN-EOS-C(3+)-EiP and GAE-CAG-eGFP/wpre lentivectors ( $2 \times 10^7$  infectious particles/ml) under the mucous coat and zona pellucida.

#### Alkaline phosphatase and β-galactosidase detection, immunolabelling, flow cytometry and confocal microscopy analysis

Alkaline phosphatase and β-galactosidase activities were assessed using a PAL 86R-1KT kit (Sigma) and a GALS staining kit (Sigma), respectively, according to the manufacturer's instructions. To detect β-galactosidase activity in viable cells, LacZ-expressing cells were analysed by flow cytometry using a FluoroReporter® lacZ flow cytometry kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions.

For immunolabelling, the cells were grown on cover slips pre-treated with gelatin and FBS and coated with feeder cells. The cells were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA; Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C for 30 min, permeabilized in Tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris pH 7.6, 0.9% NaCl, 0.2% Triton X-100) and washed three times (10 min each) in TBS. Non-specific binding sites were blocked with TBS supplemented with 10% FBS and 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h and subsequently incubated overnight at 4°C with primary antibodies (supplementary material Table S1). After three rinses (10 min each) with TBS, the cells were incubated with fluorochrome-conjugated secondary antibodies (supplementary material Table S1) at room temperature (RT) for 1 h, followed by DNA staining with 0.5 µg/ml Hoechst 33342 for 3 min. Cover slips were mounted with mounting medium M1289 (Sigma), fixed with DPX medium (Cell Path), examined under a conventional fluorescence microscope (Leica DMRE) and analysed with Mercator software (Exploranova). For flow cytometry analysis, the cells were immunolabelled using the same protocols and the same antibodies used for immunostaining on coverslips, except that incubation with antibodies was at RT for 30 min. The cells were analysed using a FACS Canto II cytometer and FACSDiva software (Becton Dickinson). The same protocol was used to detect GFP expression in rabbit blastocysts by immunolabelling, except that embryos were fixed with 2% PFA and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in TBS. After DNA staining with 3 µg/ml of propidium iodide in 1% BSA, embryos were incubated sequentially in baths (30 min each) of 10%, 20% and 40% glycerol in TBS and then mounted on slides with mounting medium M1289 (Sigma) containing 0.1% p-phenylene-diamine (w/v) (Sigma). The embryos were observed by confocal microscopy (Leica TCS SP1 microscope with LSM software) at 488 nm and 555 nm (serial slices of 4 µm).

#### Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from cell clumps, cell pellets and embryoid bodies (EBs) using an RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and reverse-transcribed using 200 U of M-MLV retrotranscriptase (Promega) and random primer mix (MWG). Real-time PCR used the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems) and Fast SBYR® Green Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Following 40 amplification cycles, melt-curve analysis was used to verify that only the desired PCR products had been amplified. PCR efficiency for both target and reference genes was determined from the relative quantitative values for calibrator-normalized target gene expression using StepOnePlus Software V2.1 (Applied Biosystems). In all cases, expression of the target genes was normalized to those of rabbit TATA-box binding protein (*Tbp*) gene. But the same results were obtained with a normalization with the mRNA level of rabbit *Gapdh* gene. All primers used for RT-PCR and qPCR are shown in supplementary material Table S2.

#### Karyotype analysis

Chromosome spreads were prepared according to standard procedures and stained with Giemsa solution (Sigma). Thirty to fifty metaphase spreads were counted for each of the rBESC and rbiPSC lines. For karyotyping, G-banding was performed using 0.045% trypsin in Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-free Tyrode (Sigma). For some rBESC

and rbiPSC line analysed, 4 to 20 banded karyotypes were evaluated for chromosomal rearrangements.

#### EB formation and teratoma production

For EB formation, rBESCs and rbiPSCs were dissociated into single cells using 0.05% trypsin, resuspended in rBESC medium without FGF2 and cultured in hanging drops. For teratoma formation,  $2.5 \times 10^6$  rBESCs or rbiPSCs were injected under the kidney capsules of 8-week-old severe combined immunodeficient (SCID) mice (CB17/SCID, Charles River). After 4–7 weeks, the mice were euthanized and lesions were surgically removed and fixed in 10% neutral buffered formalin (Curtin Matheson Scientific, Inc.) for paraffin sections, or in 4% PFA for cryosections.

#### Cell cycle analysis

Cells were cultured for 24 h with 50 ng/ml of doxorubicin hydrochloride (Adriamycin®, Sigma). Single-cell suspensions were fixed with 70% ethanol at –20°C, rehydrated with PBS at 4°C for 30 min, rinsed twice with PBS and incubated with 0.1 mg/ml of RNase A at RT for 30 min. Propidium iodide (30 mg/ml) was added to the cells for 1 min before analysis with a FACS Canto II cytometer (Becton Dickinson). Data were acquired using FACSDiva software (Becton Dickinson). The percentages of G1-, S- and G2-phase cells were determined using ModFitLT software (Verity Software House).

#### DNA methylation analysis

The methylation profile of the rabbit Oct4 promoter (GenBank: AC235550.2) was determined by bisulfite mutagenesis and sequencing as previously described (Borghol et al., 2008). Two regions of the Oct4 promoter were subjected to duplex-nested PCR. Region 1 is situated between positions –307 and +96 (25 CpG), and encompasses Conserved Region 1 (CR1) as defined by Kobolák et al. (Kobolák et al., 2009). Region 2 is situated between positions –2060 and –1626 (17 CpG sites), and encompasses Conserved Region 4 (CR4). Sequence of primers specific for bisulfite-converted DNA are as follows: Region 1, external forward: 5'-GTTTTTTTGGGAGGGGGTAGAG-3', external reverse: 5'-AAAACCTTAA-AACTCAACCAATCC-3', internal forward: 5'-ATGGGGTGGAGAGGAT-TTAG-3', internal reverse: 5'-AAAATCCACCAACCTAATCC-3'; Region 2, external forward: 5'-GTTGGTTGGGTAGGAGTTTAT-3', external reverse: 5'-TAACCTATCAAACTTCTAAAAAACT-3', internal forward: 5'-ATAAGTT-AAAGAGTTTGTGTTTGG-3', internal reverse: 5'-AACTTCTAAAAAACT-AAATAACCTAATCT-3'. The PCR products were cloned into the pNZY28-A plasmid (Nzytech; Portugal) and 24 PCR-positive colonies were sequenced for each PCR product (Biofidal, Lyon, France).

#### Rabbit microarray and hybridization

A customized rabbit microarray was designed starting from the commercially available Agilent rabbit microarray (G2519F), and including genes expressed during preimplantation development in the rabbit (B.S.-P., L.J. and V.D., unpublished data). Briefly, rabbit embryonic ESTs obtained from four suppressive subtractive cDNA hybridizations (SSH) were included in the custom-made microarray. ESTs expressed during the first cleavage stages, blastocyst stage, and early gastrulation embryos were sequenced (Léandri et al., 2009), assembled into contigs and annotated through homology searches against nucleic and proteic databases. Furthermore, candidate genes sourced from Ensembl Genome Browser (oryCun2.0), and associated with pluripotency or embryonic development, were added to the design. The best quality probes from the commercially available Agilent transcriptome-wide rabbit microarray was added, resulting in a microarray with 62, 976 probes including positive and negative controls. The 60-mer oligosequence probes were designed by eArray (<https://earray.chem.agilent.com/earray>), and were used for microarrays synthesis *in situ* using the Agilent SurePrint™ technology (Agilent Technologies, Mississauga, On, Canada) with a 8×60 K format. The custom microarray design of the platform has been submitted to the NCBI GEO (Gene Expression Omnibus). The accession number of the platform is GSE43403.

For hybridization, cyanine-3 (Cy3) labeled cRNAs were prepared from 0.2 µg RNA using the One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions. Dye incorporation and cRNA yield were checked with the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. 0.6 µg of Cy3-labelled cRNA (specific activity >6.0 pmol Cy3/µg cRNA) was fragmented at 60°C for 30 minutes following the manufacturer's instructions. Hybridizations were performed for 17 hours at 65°C in a rotating Agilent hybridization oven. After hybridization, microarrays were washed 1 minute at room temperature with GE Wash Buffer 1 (Agilent) and 1 minute with 37°C GE Wash buffer 2 (Agilent), then dried immediately. Slides were scanned immediately after washing on the Agilent DNA Microarray Scanner using one color scan setting for 8×60k array slides (Scan Area 61×21.6 mm). The scanned images were analyzed with Feature Extraction Software (Agilent, 7.10.3.1). Features flagged in Feature Extraction as Feature Non-uniform outliers were excluded. Normalization procedures were performed using R

statistical software (R: A language and environment for statistical computing (R Foundation for Statistical Computing), Vienna, Austria; 2012, R-Core-Team; <http://www.r-project.org>) and data were normalized using intra-array median subtraction and log2 transformation.

### Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) was performed on qRT-PCR data (centered and reduced) using R statistical software (FactoMineR: Multivariate exploratory: data analysis and data mining with R; R package version 1.20, 2012, Husson et al.; <http://cran.r-project.org/web/packages/FactoMineR/index.html>). Other statistical analyses were done using the test of Kruskal–Wallis. Normalized transcriptome data were analyzed by hierarchical clustering using the Pearson correlation coefficient as a measure of distance.

### Injection of cells into pre-implantation embryos and aggregation with morulas

For microinjection, ESCs and iPSCs were dissociated into single-cell suspensions. Five to 10 cells were microinjected under the mucous coat and zona pellucida of eight-cell-stage rabbit embryos. The embryos injected with GFP-expressing cells were cultured *in vitro* until they reached the mid-blastocyst stage, fixed in 2% PFA and immunostained with anti-GFP antibody.

For morula aggregation, fertilized eggs were harvested 20 hours after insemination, and cultured in RDH medium (Invitrogen), as described elsewhere (Jin et al., 2000). When they reached the eight-cell stage, embryos were treated with pronase to eliminate the zona pellucida and placed with clumps of 20–25 PSCs in microwells to induce aggregations, as described previously (Wood et al., 1993). Successful aggregates were cultured for 48 hours until they reached the blastocyst stage and subsequently analysed for  $\beta$ -galactosidase activity.

### Acknowledgements

We thank Nicolas Gadot and Jean-Yves Scoazec (ANIPATH, SFR Santé Lyon-Est, Lyon, France) for teratoma histology, Thibault Andrieu and Sébastien Dussurgey (SFR BioSciences Gerland–Lyon Sud) for technical assistance with flow cytometry and cell sorting, the INRA SIGENAE team (<http://www.sigenae.org>) for their help in designing the customized rabbit array, and Jérôme Lecardonnel for technical assistance in array hybridization. This work was supported by research grants from “Agence Nationale de la Recherche” (ANR) (project PLURABBIT no. PCS-09-GEM-08), European Cooperation in Science and Technology (COST) Action (Rabbit Genome Biology (RGB)-Net no. TD1101), the HyPharm Company (PhD Grant INRA/HyPharm no. 04012010) and the “région Rhône-Alpes” (ADR CIBLE 2010 project no. R10065CC). This work was performed within the framework of (i) the LABEX DEVWECAN (ANR-10-LABX-0061) and the LABEX CORTEX (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon (“Investissements d’Avenir” no. ANR-11-IDEX-0007), (ii) the Institute CESAME (“Investissements d’Avenir” no. ANR-10-IBHU-003) and (iii) the “Infrastructure Nationale en Biologie et Santé” INGESTEM (“Investissements d’Avenir” no. ANR-11-INBS-0009), operated by the ANR.

### Competing Interests

The authors have no competing interests to declare.

### References

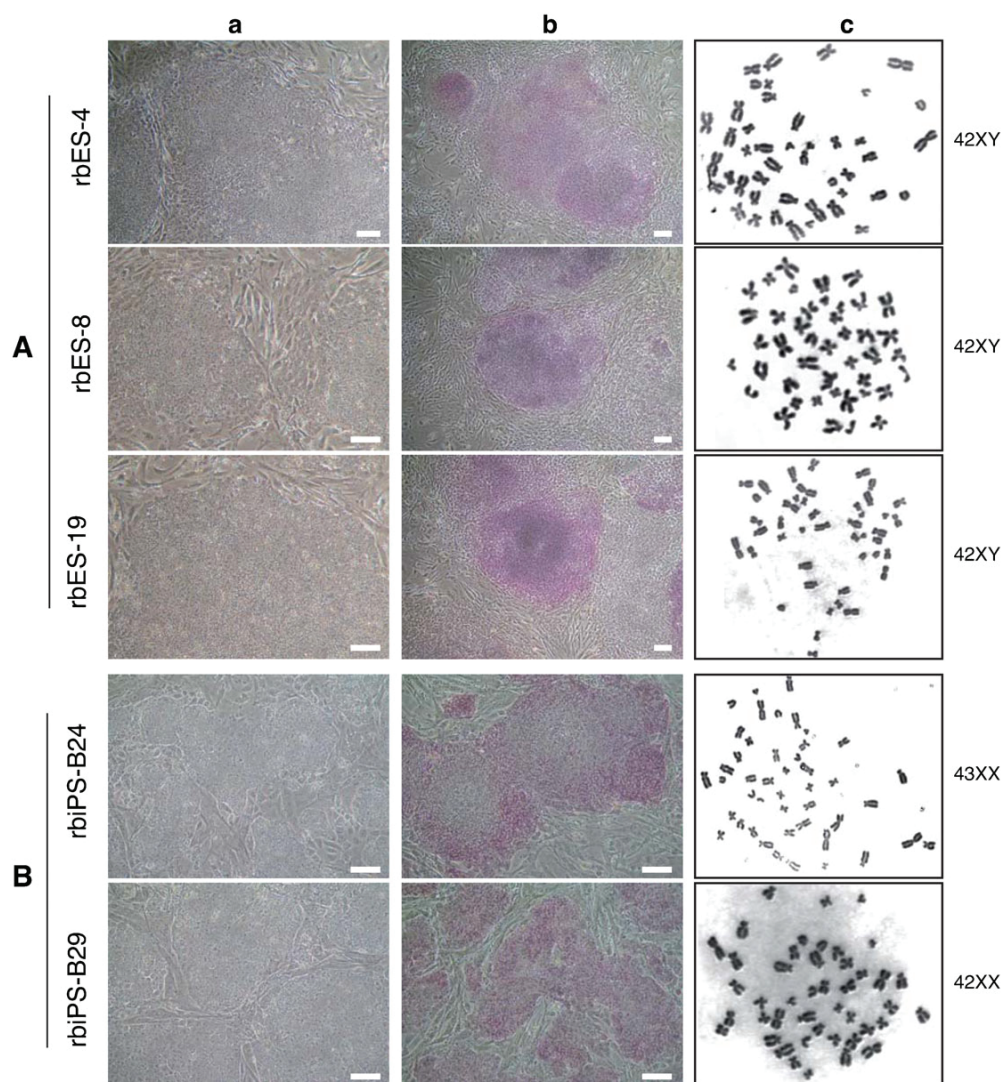
- Al-Gubory, K. H. and Houdebine, L. M. (2006). *In vivo* imaging of green fluorescent protein-expressing cells in transgenic animals using fibred confocal fluorescence microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 837–845.
- Aladjem, M. I., Spike, B. T., Rodewald, L. W., Hope, T. J., Klemm, M., Jaenisch, R. and Wahl, G. M. (1998). ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr. Biol.* **8**, 145–155.
- Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K. and Surani, M. A. (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* **461**, 1292–1295.
- Borghol, N., Blachère, T. and Lefèvre, A. (2008). Transcriptional and epigenetic status of protamine 1 and 2 genes following round spermatids injection into mouse oocytes. *Genomics* **91**, 415–422.
- Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A. et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191–195.
- Burdon, T., Smith, A. and Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* **12**, 432–438.
- Chang, K. H. and Li, M. (2013). Clonal isolation of an intermediate pluripotent stem cell state. *Stem Cells*.
- Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P. Y., Taponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R. et al. (2013). A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res.* **10**, 118–131.
- Fang, Z. F., Gai, H., Huang, Y. Z., Li, S. G., Chen, X. J., Shi, J. J., Wu, L., Liu, A., Xu, P. and Sheng, H. Z. (2006). Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. *Exp. Cell Res.* **312**, 3669–3682.
- Filipczyk, A. A., Laslett, A. L., Mummery, C. and Pera, M. F. (2007). Differentiation is coupled to changes in the cell cycle regulatory apparatus of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **1**, 45–60.
- Fluckiger, A. C., Marcy, G., Marchand, M., Nègre, D., Cosset, F. L., Mitalipov, S., Wolf, D., Savatier, P. and Dehay, C. (2006). Cell cycle features of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* **24**, 547–556.
- Hanna, J., Cheng, A. W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C. J., Soldner, F., Cassady, J. P., Muffat, J., Carey, B. W. and Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 9222–9227.
- Hawkins, K., Mohamet, L., Ritson, S., Merry, C. L. and Ward, C. M. (2012). E-cadherin and, in its absence, N-cadherin promotes Nanog expression in mouse embryonic stem cells via STAT3 phosphorylation. *Stem Cells* **30**, 1842–1851.
- Honda, A., Hirose, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Shimozaawa, N., Hatori, M., Shimizu, N., Murata, T., Hirose, M. et al. (2008). Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reprod. Biomed. Online* **17**, 706–715.
- Honda, A., Hirose, M. and Ogura, A. (2009). Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* **315**, 2033–2042.
- Honda, A., Hirose, M., Hatori, M., Matoba, S., Miyoshi, H., Inoue, K. and Ogura, A. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J. Biol. Chem.* **285**, 31362–31369.
- Hong, Y. and Stambrook, P. J. (2004). Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14443–14448.
- Hotta, A., Cheung, A. Y., Farra, N., Vijayaragavan, K., Séguin, C. A., Draper, J. S., Pasceri, P., Maksakova, I. A., Mager, D. L., Rossant, J. et al. (2009). Isolation of human iPSCs using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat. Methods* **6**, 370–376.
- Jin, D. I., Kim, D. K., Im, K. S. and Choi, W. S. (2000). Successful pregnancy after transfer of rabbit blastocysts grown *in vitro* from single-cell zygotes. *Theriogenology* **54**, 1109–1116.
- Kobolav, J., Kiss, K., Polgar, Z., Mamo, S., Rogel-Gaillard, C., Tancos, Z., Bock, I., Baji, A. G., Tar, K., Pirity, M. K. et al. (2009). Promoter analysis of the rabbit POU5F1 gene and its expression in preimplantation stage embryos. *BMC Mol. Biol.* **10**, 88.
- Léandri, R. D., Archilla, C., Bui, L. C., Peynot, N., Liu, Z., Cabau, C., Chastellier, A., Renard, J. P. and Duranthon, V. (2009). Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. *Physiol. Genomics* **36**, 98–113.
- Mangeot, P. E., Duperrier, K., Nègre, D., Boson, B., Rigal, D., Cosset, F. L. and Darlix, J. L. (2002). High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol. Ther.* **5**, 283–290.
- Momcilovic, O., Knobloch, L., Fornasaglio, J., Varum, S., Easley, C. and Schatten, G. (2010). DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *PLoS ONE* **5**, e13410.
- Mountford, P., Zevnik, B., Düwel, A., Nichols, J., Li, M., Dani, C., Robertson, M., Chambers, I. and Smith, A. (1994). Dicerin targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4303–4307.
- Mummery, C. L., van den Brink, C. E. and de Laat, S. W. (1987). Commitment to differentiation induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells is cell cycle dependent. *Dev. Biol.* **121**, 10–19.
- Murakami, H. and Imai, H. (1996). Successful implantation of *in vitro* cultured rabbit embryos after uterine transfer: a role for mucin. *Mol. Reprod. Dev.* **43**, 167–170.
- Nichols, J. and Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4**, 487–492.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H. and Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 5307–5317.
- Salveti, P., Buff, S., Afanassieff, M., Daniel, N., Guérin, P. and Joly, T. (2010). Structural, metabolic and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing. *Theriogenology* **74**, 847–855.
- Sandrin, V., Boson, B., Salmon, P., Gay, W., Nègre, D., Le Grand, R., Trono, D. and Cosset, F. L. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* **100**, 823–832.
- Savatier, P., Lapillonne, H., van Grunsven, L. A., Rudkin, B. B. and Samarut, J. (1996). Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor

- up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* **12**, 309-322.
- Sela, Y., Molotski, N., Golan, S., Itskovitz-Eldor, J. and Soen, Y. (2012). Human embryonic stem cells exhibit increased propensity to differentiate during the G1 phase prior to phosphorylation of retinoblastoma protein. *Stem Cells* **30**, 1097-1108.
- Suter, D. M., Cartier, L., Bettiol, E., Tirefort, D., Jaconi, M. E., Dubois-Dauphin, M. and Krause, K. H. (2006). Rapid generation of stable transgenic embryonic stem cell lines using modular lentivectors. *Stem Cells* **24**, 615-623.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.
- Tang, F., Barbacioru, C., Bao, S., Lee, C., Nordman, E., Wang, X., Lao, K. and Surani, M. A. (2010). Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell* **6**, 468-478.
- Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L. and McKay, R. D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196-199.
- Wang, S., Tang, X., Niu, Y., Chen, H., Li, B., Li, T., Zhang, X., Hu, Z., Zhou, Q. and Ji, W. (2007). Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**, 481-489.
- Wang, S., Shen, Y., Yuan, X., Chen, K., Guo, X., Chen, Y., Niu, Y., Li, J., Xu, R. H., Yan, X. et al. (2008). Dissecting signaling pathways that govern self-renewal of rabbit embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 35929-35940.
- Wang, L., Xue, Y., Shen, Y., Li, W., Cheng, Y., Yan, X., Shi, W., Wang, J., Gong, Z., Yang, G. et al. (2012). Claudin 6: a novel surface marker for characterizing mouse pluripotent stem cells. *Cell Res.* **22**, 1082-1085.
- Wianny, F., Bernat, A., Huissoud, C., Marcy, G., Markossian, S., Cortay, V., Giroud, P., Levie, V., Kennedy, H., Savatier, P. et al. (2008). Derivation and cloning of a novel rhesus embryonic stem cell line stably expressing tau-green fluorescent protein. *Stem Cells* **26**, 1444-1453.
- Wood, S. A., Allen, N. D., Rossant, J., Auerbach, A. and Nagy, A. (1993). Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature* **365**, 87-89.
- Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hübner, K. and Schöler, H. R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* **122**, 881-894.

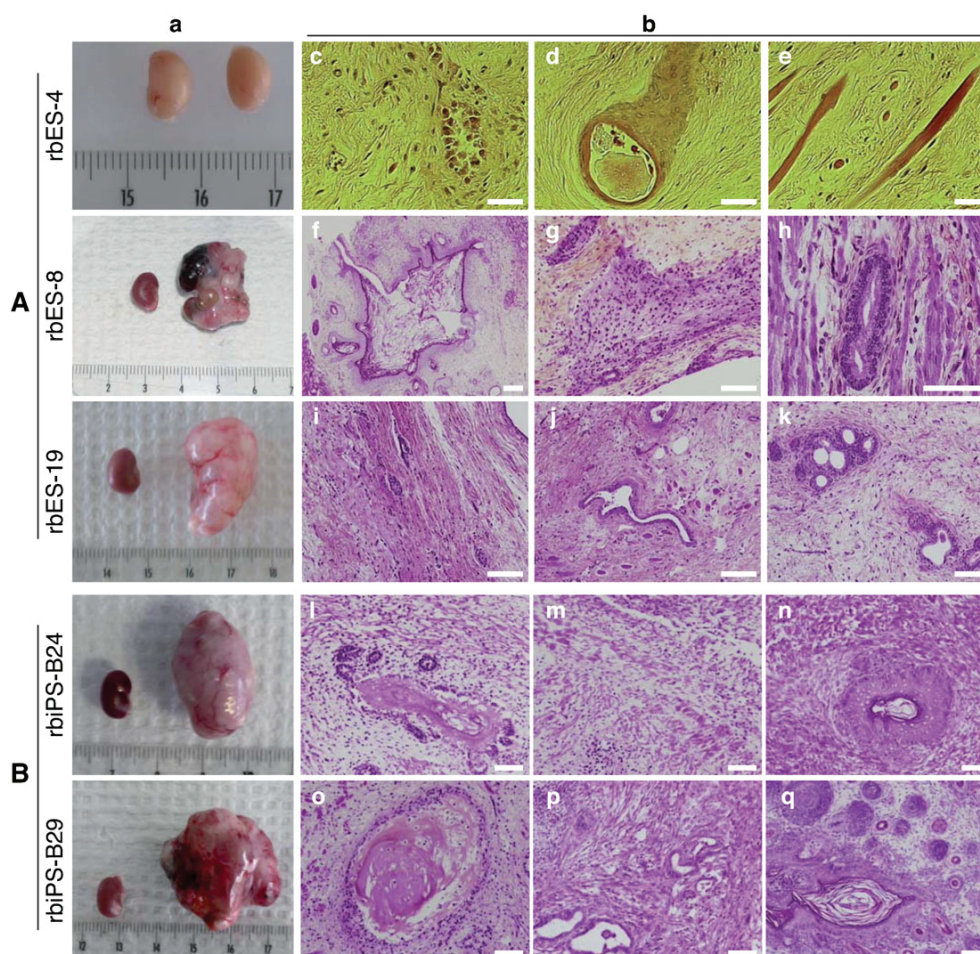


# Supplementary Material

Pierre Osteil et al. doi: 10.1242/bio.20134242

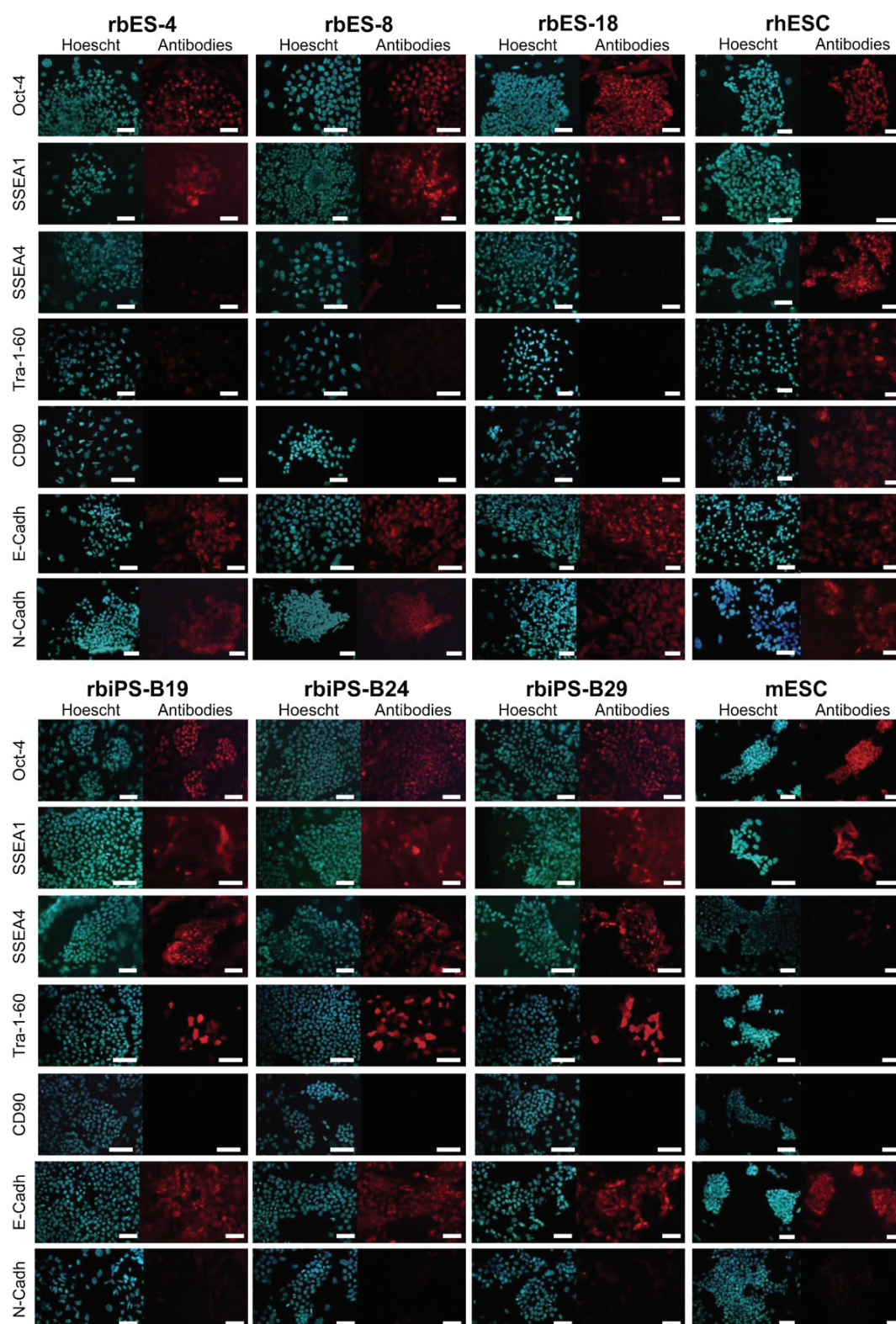


**Fig. S1. Alkaline phosphatase activity and metaphase spreads in rabbit PSC lines.** (A) rbESC lines. (B) rbiPSC lines. (a) Phase-contrast images. (b) Alkaline phosphatase activity. (c) Spreads of metaphase chromosomes at P13 (rbES-4), P17 (rbES-8), P21 (rbES-19), P33 (rbiPS-B24), and P31 (rbiPS-B29) (P=passage). Scale bars: 50 µm.

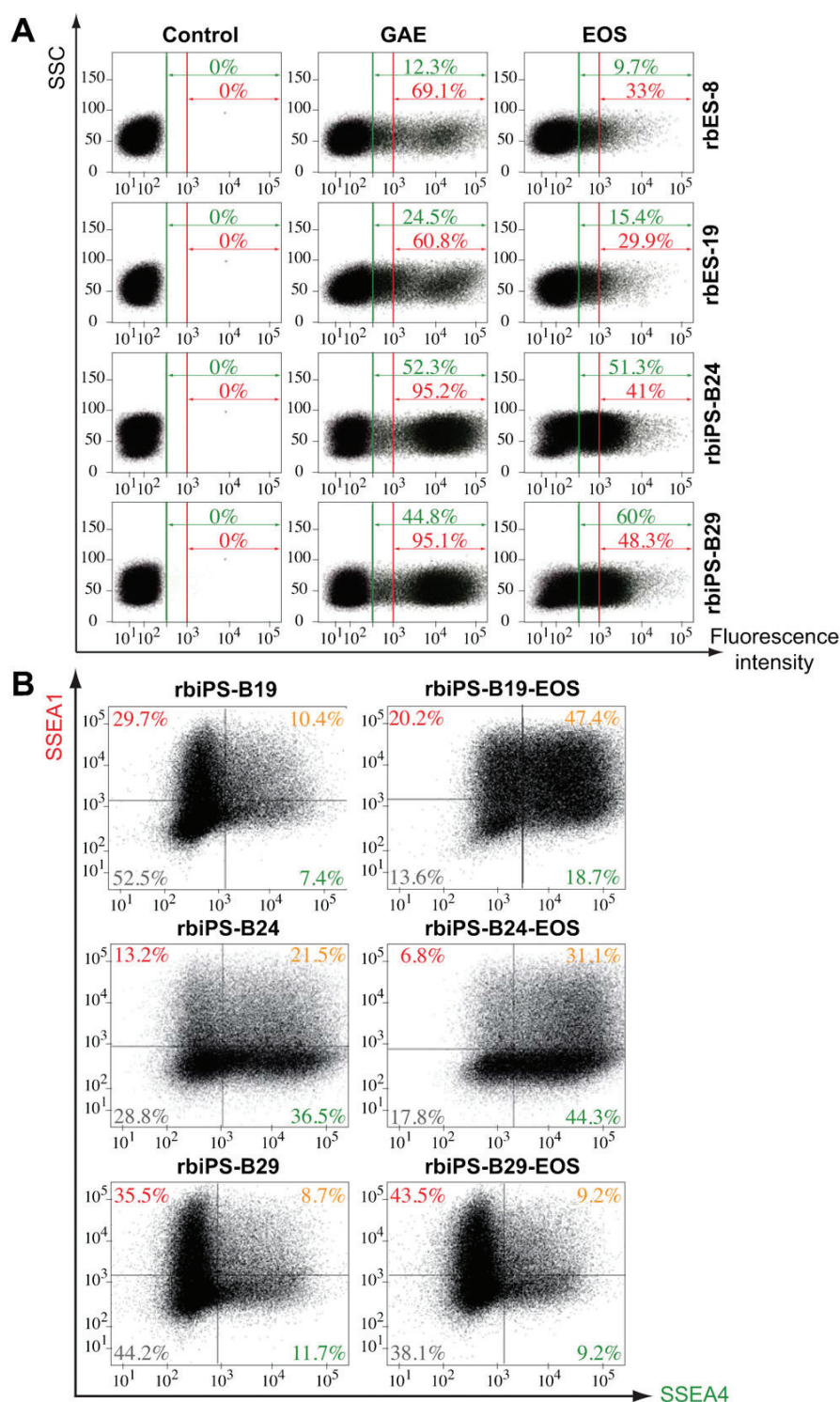


**Fig. S2. Teratoma formation using rabbit PSC lines.** (A) rbESC lines. (B) rbiPSC lines. (a) Images of teratomas 28–50 days after injecting  $2\text{--}5 \times 10^6$  cells under the kidney capsule of SCID mice (note: for rbES-4 cells, teratomas were evaluated after 140 days after injecting  $0.5\text{--}1 \times 10^6$  cells into each testis of SCID mice). (b) Staining of teratoma sections with HPS, which shows skin structures (f), neuronal cells (g,i), gland structures (c,h,i,k,l,p), muscle cells (e,j,k,m,n,p), squamous epithelia cells (j,n,q), and cartilage and bone structures (d,o). Scale bars: 50 μm.





**Fig. S3.** Expression of pluripotency and cell-surface markers by rabbit PSC lines. Immunolabeling of Oct4, SSEA1, SSEA4, Tra-1-60, CD90, E-cadherin and N-cadherin. Scale bars: 50  $\mu$ m.



**Fig. S4. Mouse Oct4 promoter activities and expressions of cell-surface markers in rabbit PSC lines.** (A) Flow cytometry analysis of rbES-8, rbES-19, rbiPS-B24, and rbiPS-B29 4 days after infection with the GAE and EOS lentivectors. For each dot plot, the numbers in green indicate the percentages of all GFP<sup>+</sup> cells. Numbers in red indicate the percentages of GFP<sup>+</sup> cells that had a fluorescence level of  $\geq 10^3$ , normalized to the percentage of all GFP<sup>+</sup> cells. (B) Flow cytometry analysis of SSEA1 and SSEA4 marker expression by rbiPS-B19-EOS, rbiPS-B24-EOS, and rbiPS-B29-EOS lines before (left panels) and after (right panels) puromycin selection. Of note, immunolabeling and flow cytometry analysis were performed after cell fixation to eliminate GFP fluorescence resulting from EOS lentivector expression.



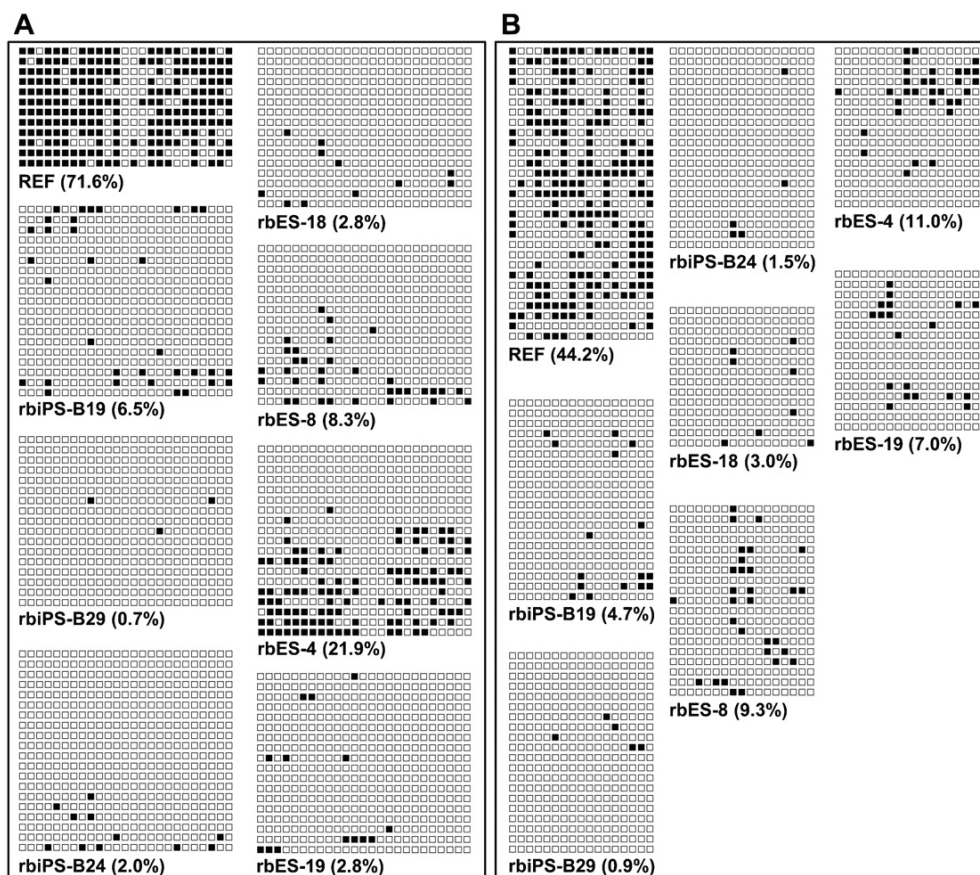


Fig. S5. Bisulfite genomic sequencing of the CR1 and CR4 promoter regions of Oct4 in rbESCs, rbiPSCs, and rabbit embryonic fibroblasts (REF). (A) CR1 promoter region. (B) CR4 promoter region. Open circles indicate unmethylated CpG dinucleotides while closed circles indicate methylated CpGs.

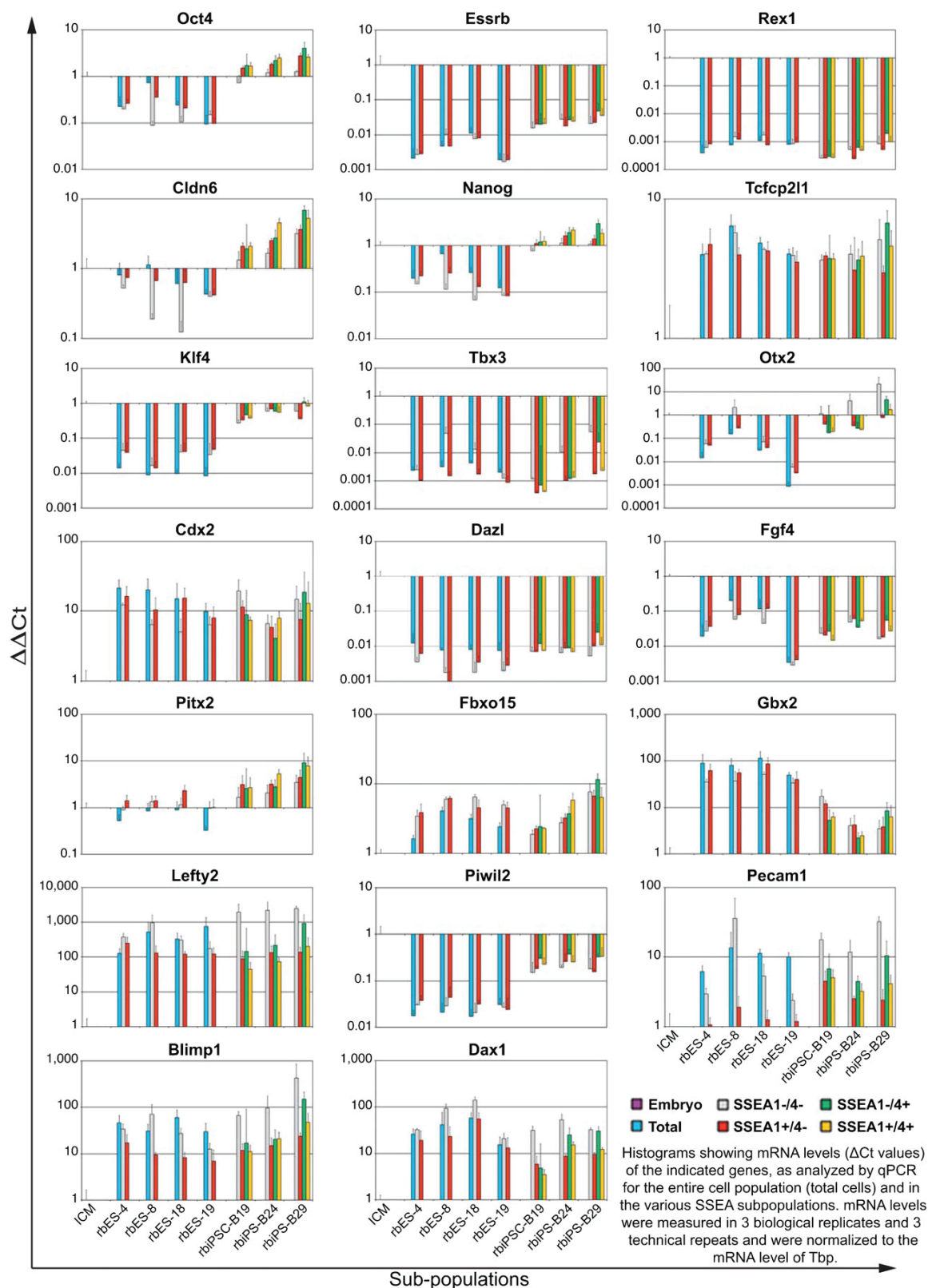


Fig. S6. Expression of pluripotency markers by rbESC and rbiPSC lines.

Table S1. List of antibodies.

Molecule	Antibodies	Dilution	Manufacturer	Reference	Method
<b>GFP</b>	AF488 <sup>a</sup> Anti-GFP Rabbit IgG	1/1000	Invitrogen	A21311	IF <sup>c</sup>
<b>OCT-4</b>	1°: Anti-Oct-4 Rabbit IgG	1/300	Santa Cruz	SC-9081	IF
	2°: AF555 <sup>b</sup> Goat Anti-Rabbit IgG	1/1000	Invitrogen	A21429	
<b>SSEA1</b>	PE Anti-SSEA1 Mouse IgM	1/50	R&D Systems	FAB2155P	IF
	AF647 Anti-SSEA1 Mouse IgM	1/100	Santa Cruz	SC-21702	FC <sup>d</sup>
<b>SSEA4</b>	1°: Anti-SSEA4 Mouse IgG	1/100	Millipore	MAB4304	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgG	1/100	Invitrogen	A21422	
	1°: Anti-SSEA4 Mouse IgG	1/200	Santa Cruz	SC-21704	FC
	2°: AF488 Goat anti-Mouse IgG	1/1000	Invitrogen	A11017	
<b>Tra-1-60</b>	1°: Anti-Tra-1-60 Mouse IgM	1/50	Millipore	MAB4360	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgM	1/500	Invitrogen	A21426	
<b>E-Cadh</b>	PE Anti-E-Cadherin Rat IgG2A	1/50	R&D Systems	FAB7481P	IF
<b>N-Cadh</b>	1°: Anti-N-Cadherin Rabbit IgG	1/200	Santa Cruz	SC-7939	IF
	2°: Rhodamine Goat anti-Rabbit IgG	1/1000	Molecular Probes	RG314	
<b>Desmin</b>	1°: Anti-Desmin Mouse IgG1	1/50	DakoCytomation	M0760	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgG	1/800	Invitrogen	A21422	
<b>GFAP</b>	1°: Anti-GFAP Rabbit IgG	1/1000	DakoCytomation	Z0334	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Rabbit IgG	1/800	Invitrogen	A21429	
<b>Glucagon</b>	1°: Anti-Glucagon Mouse IgG1	1/500	Sigma	G2654	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgG	1/800	Invitrogen	A21422	
<b>CD90</b>	1°: Anti-CD90 Mouse IGG	1/50	PharmingenTM	550402	IF
	2°: AF555 Goat Anti-Mouse IgM	1/500	Invitrogen	A21426	

<sup>a</sup>AlexaFluor 488;<sup>b</sup>AlexaFluor 555;<sup>c</sup>Immunostaining;<sup>d</sup>Flow cytometry.

**Table S2. List of primers used for RT-PCR and Q-PCR analysis.**

Gene	Origin	Primers	Annealing temperature	Method
<i>Tbp</i>	Rabbit	Forward: CTTGGCTCCTGTGCACACCATT Reverse: ATCCCAAGCGGTTTGCTGCTGT	60°C	qPCR
<i>Gadph</i>	Rabbit	Forward: GAGCTGAACGGGAAACTCAC Reverse: CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT	56°C	RT-PCR
<i>Gadph</i>	Rabbit	Forward: TTCCACGGCACGGTCAAGGC Reverse: GGGCACCAGCATCACCCAC	60°C	qPCR
<i>Nanog</i>	Rabbit	Forward: CCTCAGCCTTCAGCAGATGCAAGAACTC Reverse: GGCAGTGGTGTAGGCAGCCCC	58°C	RT-PCR
<i>Nanog</i>	Rabbit	Forward: CACTGATGCCCGTGGTGCC Reverse: AGCGGAGAGGCGGTGTCTGT	60°C	qPCR
<i>Oct4</i>	Rabbit	Forward: GCAGATCAGCCACATCGCCACGC Reverse: GCGTCTCCCCTGACCTCTGCCTC	60°C	RT-PCR
<i>Oct4</i>	Rabbit	Forward: CCTGCTCTGGGCTCCCCAT Reverse: TGACCTCTGCCTCCACCCG	60°C	qPCR
<i>OCT4</i>	Human	Forward: CAGGGCCCCATTTTGGTACC Reverse: TTATCGTCGACCACTGTGCTGGCG	60°C	RT-PCR
<i>SOX2</i>	Human	Forward: CCTCCGGACATGATCAGC Reverse: TTATCGTCGACCACTGTGCTGGCG	60°C	RT-PCR
<i>KLF4</i>	Human	Forward: TTCGCCGCTCAGATGAAGT Reverse: TTATCGTCGACCACTGTGCTGGCG	60°C	RT-PCR
<i>Klf4</i>	Rabbit	Forward: TCCGGCAGGTGCCCGAATA Reverse: CTCGCCGCTCTCCAGGTCT	60°C	qPCR
<i>C-MYC</i>	Human	Forward: CAGCATACATCCTGTCCGTCC Reverse: TTATCGTCGACCACTGTGCTGGCG	60°C	RT-PCR
<i>Dazl</i>	Rabbit	Forward: CACAGTGGCCTACTGGGAACA Reverse: TTCGGCGCCTGGGTCAACTT	60°C	qPCR
<i>Hnf3β</i>	Rabbit	Forward: GTACGCCAACATGAACCTCA Reverse: GAGGAAGCAGTCGTTGAAGG	55°C	RT-PCR
<i>Tbx3</i>	Rabbit	Forward: TGGATTCTGGGCTCGGAAGTGA Reverse: AGCCGCTGGATGCTCTGAAGT	60°C	qPCR
<i>Blimp1</i>	Rabbit	Forward: AGCGGCGAACGGCCTTTCAAAT Reverse: GACCTGGCATTTCATGCGGCTTT	60°C	qPCR
<i>Lefty2</i>	Rabbit	Forward: ACTGCCGATTGCCCCATGAT Reverse: AGCTGCACTGCTTCACCTCAT	60°C	qPCR
<i>Dax1</i>	Rabbit	Forward: GCCTGCAGTGCGTGAAGTACA Reverse: CGGTGCGTCATCCTGACGTG	60°C	qPCR
<i>Nestin</i>	Rabbit	Forward: AGAATTCCCGCTTCAGACA Reverse: TCTTCAGAAAGGCTGGCACA	55°C	RT-PCR
<i>Fbxo15</i>	Rabbit	Forward: AGGCTCGGCCACTGTTCTT Reverse: CACGTGGAGCTGGTAGCCATGT	60°C	qPCR
<i>Flk1</i>	Rabbit	Forward: GTATATCTGTGCGGCTCCA Reverse: ATGGGGTTGGTGAGGATGAC	59°C	RT-PCR
<i>Pecam1</i>	Rabbit	Forward: AGAGGAGCTGGAGCGGTGTAAT Reverse: GCTGATGTGGAACCTTCGGAACAGA	60°C	qPCR
<i>Piwi2</i>	Rabbit	Forward: TGACCTTCCGGATCCTTCAGTGT Reverse: TCCGAACTCCCTCTTCCAAGCATT	60°C	qPCR
<i>Gbx2</i>	Rabbit	Forward: AACGCGTGAAGCGGGCAAT Reverse: TGCTGGTGCTGGCTCCGAAT	60°C	qPCR
<i>Rex1</i>	Rabbit	Forward: AGCCAGCAGGCAGAAATGGAA Reverse: TGGTCAGTCTCACAGGGCACAT	60°C	qPCR
<i>Fgf4</i>	Rabbit	Forward: ACGCAGACACGAGCGACAGC Reverse: CGGCTGGCCACGCCAAAGAT	60°C	qPCR
<i>Otx2</i>	Rabbit	Forward: TCCGGCTCGGGAAGTGAGTT Reverse: GGAGCACTGCTGCTCGCAAT	60°C	qPCR
<i>Cldn6</i>	Rabbit	Forward: GCAGCCTCGGGCCTTTTGTGTG Reverse: TCGGGCCAGACGCTGAGTAG	60°C	qPCR
<i>Pitx2</i>	Rabbit	Forward: ACTAGCGCGCAGCTCAAGGA Reverse: CAGCTCCTCGCGCTGTAAA	60°C	qPCR
<i>Cdx2</i>	Rabbit	Forward: CTCAACCTGGCGCCGAGAA Reverse: GCGCGCTGTCCAAGTTCGC	60°C	qPCR
<i>Cdh1</i>	Rabbit	Forward: TGCACAGGCCGGAACACAGT Reverse: ACGGCCTTCAGCGTGACCTT	60°C	qPCR
<i>Cdh2</i>	Rabbit	Forward: CCGTGGCAGCTGGACTGGAT Reverse: GATGACGGCCGTGGCTGTGT	60°C	qPCR
<i>Essrb</i>	Rabbit	Forward: CGTGGAGGCCGCCAGAAAGTA Reverse: TCTGGCTCGGCCACCAAGAG	60°C	qPCR
<i>Tcfep2</i>	Rabbit	Forward: AGAAAAGGGCGTGCCGTTC Reverse: TGGCAGCTGGCTGAGTGCAA	60°C	qPCR

**Table S3. Percentages of pluripotent stem cells in G1-, S-, and G2/M phases.**

Pluripotent stem cells	Lines	Cell-cycle phases	Percentages of cells in G1-, S-, and G2/M phases				
			Whole cell populations	SSEA1 <sup>+</sup> SSEA4 <sup>−</sup> cells	SSEA1 <sup>+</sup> SSEA4 <sup>+</sup> cells	SSEA1 <sup>−</sup> SSEA4 <sup>+</sup> cells	SSEA1 <sup>−</sup> SSEA4 <sup>−</sup> cells
Control-	rbF	G1	80.6	—	—	—	—
		S	6.7				
		G2/M	12.7				
mESCs	CGR8	G1	20.7	16.6	—	—	28.0
		S	68.3	71.3			63.8
		G2/M	11.0	12.1			8.2
mEpiSCs	—	G1	28.5	—	—	—	—
		S	56.6				
		G2/M	14.9				
rhESCs	LyonES	G1	41.3	—	—	41.1	40.4
		S	41.4			40.7	40.5
		G2/M	17.3			18.2	19.1
rbESCs	rbES-4	G1	70.6	57.0	—	—	75.3
		S	19.2	35.0			16.7
		G2/M	10.2	8.0			8.0
	rbES-8	G1	76.8	65.9	—	—	78.2
		S	15.3	22.1			14.6
		G2/M	7.9	12.0			7.2
	rbES-18	G1	76.9	56.6	—	—	80.4
		S	20.2	27.2			19.3
		G2/M	2.9	16.2			0.3
	rbES-19	G1	72.7	55.5	—	—	75.0
		S	23.0	28.0			21.5
		G2/M	4.3	16.5			3.5
rbiPSCs	rbiPS-B19	G1	40.8	36.0	30.8	42.9	45.8
		S	39.4	39.6	40.9	39.1	38.1
		G2/M	19.8	24.4	28.3	18.0	16.1
	rbiPS-B24	G1	46.5	41.4	35.5	39.8	49.0
		S	33.8	32.4	26.4	38.1	33.8
		G2/M	19.7	26.2	38.1	22.1	17.2
	rbiPS-B29	G1	42.2	39.0	33.9	32.8	49.6
		S	42.1	45.9	37.6	51.9	39.0
		G2/M	15.7	15.1	28.5	15.2	11.4

**Table S5. Colonization of rabbit pre-implantation embryos by rbESCs, mESCs, and rbiPSCs.**

Technique	Marker gene	Line	Number of embryos	Number of blastocysts (percentage)	Number of positive embryos (percentage)
Microinjection of 5–10 cells into 8-cell stage embryos	GFP	rbES-18	20	16 (80%)	0
		rbES-18 SSEA1 <sup>+</sup>	67	58 (87%)	0
		mESC CGR8-GFP	15	15 (100%)	15 (100%)
		rbiPS-B19-GFP	47	47 (100%)	1 (2.1%)
		rbiPS-B19-GFP SSEA1 <sup>+</sup>	65	64 (98%)	1 (1.5%)
Aggregation between clumps of 20–25 cells and 8-cell stage embryos	LacZ	rbiPS-B19-LacZ-EOS	114	62 (54%)	10 (16.1%)

**Article n°3 : Contrasting transcriptome  
landscapes of rabbit pluripotent stem  
cells in vitro and in vivo**

(Publié dans *Animal Reproduction Science* en juillet 2014 pages 67- 79)



### 1.3. Comparaison moléculaire des PSCs chez le lapin

Les états de pluripotence définis chez la souris sont caractérisés par les mESCs et les EpiSCs. Chez les autres espèces, l'évaluation du statut de pluripotence se base essentiellement sur les critères et les marqueurs définis chez la souris. Or, des différences liées à l'espèce et non au statut de pluripotence peuvent exister. Aucune lignée cellulaire n'a été stabilisée à l'état naïf chez le lapin, ne permettant pas d'en définir les propriétés. Cependant, un parallèle peut être fait entre les mESCs/EpiSCs et les cellules de l'embryon à différents stades de développement. C'est pourquoi, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Véronique Duranthon, nous avons analysé et comparé le transcriptome des cellules de l'ICM, de l'épiblaste, des ESCs et des iPSCs de lapin. Ainsi l'ICM de blastocystes précoces à E3,5 sert de référence pour l'état naïf et les cellules de l'épiblaste préimplantatoire à E6 servent de référence pour l'état amorcé. Enfin les transcriptomes de 4 lignées de RbESCs et de 2 lignées de RbiPSCs ont été analysés et comparés aux cellules de l'embryon. Les puces à ADN utilisées ici sont des puces Agilent® à façon, optimisées pour détecter les gènes exprimés dans les premières étapes du développement embryonnaire chez le lapin.

Deux grandes questions sont posées ici : la première est de savoir si les gènes différentiellement exprimés entre l'ICM et l'Epi sont communs entre le lapin et la souris ; la deuxième est d'évaluer si certaines lignées de RbPSCs se rapprochent plus de l'ICM ou de l'Epi.

Il ressort de cette étude que l'ICM et l'Epi de lapin expriment différentiellement de nombreux marqueurs communs avec la souris (*Klf4*, *Tbx3*, *Esrrb*, *Dppa3* et *Dazl*). Toutefois, des différences probablement liées à l'espèce ont été observées, suggérant que certains marqueurs murins ne discriminent pas l'état naïf et amorcé chez le lapin.

Bien que l'analyse de leurs transcriptomes permette de distinguer les RbESCs des RbiPSCs, les deux types cellulaires sont très proches entre eux et diffèrent des cellules de l'embryon. L'analyse détaillée de groupes fonctionnels de gènes confirme bien la ségrégation entre les cellules *in vitro* (RbESCs et RbiPSCs) et les cellules *in vivo* (ICM et Epi). La signature moléculaire des cellules *in vitro* suggère qu'elles sont stabilisées dans un état de pluripotence amorcé voire proche de l'engagement vers la différenciation.

**Article n°4 : Transcriptome reconfiguration of rabbit induced pluripotent stem cells toward those of inner cell mass cells induced by Krüppel-like factors**

(Article en cours de soumission à *Stem Cell*)

## 2. La réversion des RbiPSCs vers l'état naïf de pluripotence

La première partie de mon projet doctoral a été consacrée à l'obtention et la caractérisation détaillée des RbiPSCs. L'ensemble des résultats présentés dans les deux précédentes études a permis de définir les propriétés des PSCs chez le lapin. Cependant, les cellules obtenues s'auto-renouvellent à l'état amorcé comme en témoigne leur capacité réduite à coloniser l'embryon de lapin. Nous avons vu dans l'introduction que de nombreuses études portaient sur la transition entre les états de pluripotence et notamment de la reprogrammation des cellules amorcées à l'état naïf ; c'est pourquoi la deuxième partie de mes travaux a été consacrée à la réversion des RbiPSCs.

Nous avons choisi de surexprimer les gènes humains *KLF2* et *KLF4*, afin de réverter les RbiPSCs. Trois clones cellulaires appelés EKs (Enhanced KLFs) ont été sélectionnés selon leur niveau d'expression des transgènes (faible, moyen et fort). De plus, différentes conditions de cultures ont été testées. Afin de déterminer la combinaison optimum, le profil d'expression des cellules a été analysé par RT-qPCR sur les 22 gènes précédemment utilisés pour discriminer les états naïf et amorcé (Osteil et al., 2013). De cette analyse ressort qu'un haut niveau d'expression des KLFs combiné aux conditions de culture des mESCs 10%FBS/LIF (S<sub>10</sub>L) permet d'obtenir un profil d'expression plus proche de l'ICM de lapin.

La comparaison des RbiPSCs et des cellules EK-S<sub>10</sub>L montre des changements importants dans leur signature moléculaire. En effet, les cellules EK-S<sub>10</sub>L surexpriment de nombreux facteurs de transcription impliqués dans l'autorenouvellement des cellules naïves. C'est également vrai pour l'expression des miRNAs spécifiques des états de pluripotence. A l'inverse des RbiPSCs, mais comme l'ICM de lapin, les cellules EK-S<sub>10</sub>L expriment fortement le cluster miR290 et plus faiblement le cluster miR302. Ces résultats sont également confirmés par l'analyse globale du transcriptome qui montre que les cellules EK-S<sub>10</sub>L forment un cluster séparé des RbiPSCs et se rapprochent des cellules de l'embryon.

Enfin, de manière cohérente avec ce remaniement moléculaire, les cellules EKs présentent une capacité accrue à coloniser l'embryon préimplantatoire de lapin bien qu'ayant une capacité réduite à participer au développement.

# DISCUSSION

*« C'est ce que nous pensons déjà connaître  
qui nous empêche souvent d'apprendre. »*

Claude Bernard (1813-1878)

# DISCUSSION

## 1. Résultats complémentaires et discussion:

Les premières PSCs de lapin ont été obtenues récemment et restent peu documentées. C'est dans ce cadre que s'inscrit mon travail de doctorat, visant tout d'abord à obtenir et caractériser des RbiPSCs. L'évaluation du niveau de pluripotence des RbPSCs est au cœur de ce travail qui a conduit à la réversion des RbiPSCs B19EOS vers l'état naïf de pluripotence et à l'obtention des lignées EK. J'utiliserai le terme RbESCs et RbiPSCs pour faire référence aux cellules cultivées en KOSR/FGF2 et EK-S<sub>10</sub>L pour les RbiPSCs révertées, cultivées en FBS/LIF.

### 1.1. Les différences observées entre RbESCs et RbiPSCs

Comme nous l'avons rapporté dans le premier article (Osteil et al., 2013), la comparaison entre les différentes lignées de RbESCs et RbiPSCs obtenues au laboratoire a mis en évidence de nombreuses différences entre ces deux types de PSCs. Contrairement aux RbESCs, les RbiPSCs présentent certaines caractéristiques associées à l'état naïf de pluripotence comme : (i) la résistance à la dissociation enzymatique à la trypsine ; (ii) l'expression de la cadhérine-E ; (iii) une forte activité de la région conservée 4 de l'enhancer distal d'*Oct4*, (iiii) une capacité de colonisation de l'embryon par agrégation avec une morula. De plus, les RbiPSCs possèdent certaines caractéristiques plus proches des cellules pluripotentes murines et humaines que les RbESCs comme : (i) un profil de cycle cellulaire avec une plus faible proportion de cellules en phase G1 ; (ii) l'existence d'un seul point de contrôle en phase G2 en réponse au dommage à l'ADN ; (iii) un niveau d'expression supérieur des gènes associés à la pluripotence naïve comme *Cdh1*, *Essrb*, *Klf4*, *Pecam1*, *Piwil2* et *Dazl*. Il est apparu que l'expression différentielle de *Cdh1* (Cad E) et *Cdh2* (Cad N) était un bon critère pour distinguer les RbESCs (*Cdh1*<sup>faible</sup>/*Cdh2*<sup>élevé</sup>) des RbiPSCs (*Cdh1*<sup>élevé</sup>/*Cdh2*<sup>faible</sup>). Le statut d'expression des cadhérines n'a pas été évalué chez le lapin (Fang et al., 2006; Honda et al., 2008; Wang et al., 2007; Zakhartchenko et al., 2011) alors qu'il permet de discriminer l'état naïf et amorcé chez la souris (Bao et al., 2009).

De nombreuses études rapportent que les iPSCs de primates ou de souris, se rapprochent souvent des ESCs mais conservent plus ou moins de différences épigénétiques, transcriptionnelles voire fonctionnelles avec ces dernières (Kim et al., 2010; Miura et al., 2009; Polo et al., 2010). Les ESCs représentent le "Gold-standard" dont les iPSCs tendent à se

rapprocher. De manière originale, notre étude rapporte que les RbESCs semblent stabilisées à un niveau de pluripotence plus proche de l'engagement vers la différenciation que les RbiPSCs.

Les conditions de cultures sont identiques entre les RbESCs et RbiPSCs à l'exception de la technique d'amplification, à savoir mécanique pour les RbESCs et enzymatique pour les RbiPSCs. La résistance à la dissociation à la trypsine est l'une des caractéristiques naïves des RbiPSCs. L'utilisation de la trypsine permet-elle d'expliquer les différences observées entre les RbESCs et les RbiPSCs ? Ou est ce que cette résistance est simplement liée à l'utilisation de la trypsine lors du processus de d'obtention des PSCs ?

Au laboratoire, l'utilisation de la trypsine ne permet pas de maintenir les RbESCs en culture et conduit à leur différenciation après seulement quelques passages. Ce phénomène a été observé en utilisant des lignées de RbESCs établies (normalement amplifiées par dissociation mécanique), mais également lors de la dérivation de nouvelles lignées amplifiées uniquement par dissociation à la trypsine. Ces résultats indiquent que l'utilisation de la trypsine lors du processus d'obtention des PSCs n'est pas suffisante pour expliquer la résistance des cellules à cette dernière. Les RbESCs ainsi que les RbiPSCs obtenues par l'équipe de Atsuo Ogura sont également dissociées à la trypsine ([Honda et al., 2008, 2010](#)). On peut noter qu'ils utilisent un traitement court à la trypsine (1min à RT) et n'obtiennent pas une suspension unicellulaire, mais des amas qu'ils dissocient mécaniquement. Ce traitement très court pourrait expliquer la résistance de leur PSCs à la dissociation à la trypsine. L'ensemble de ces observations indique que la résistance à la dissociation à la trypsine est une caractéristique spécifique des RbiPSCs obtenues au laboratoire. Cette résistance apparaît comme une conséquence de l'état de pluripotence des RbiPSCs. Cela suggère qu'en utilisant les mêmes conditions de culture la reprogrammation peut permettre d'obtenir des cellules dans un état de pluripotence plus stable que la dérivation.

De manière similaire, chez de nombreuses espèces (porc, cheval, mouton...), les tentatives pour obtenir des ESCs sont restées vaines. Bien que certaines publications font mention de l'obtention de cellules ES, elles ne remplissent souvent pas tous les critères pour vraiment être qualifiées comme telles. Ces cellules sont généralement instables en culture et restent inutilisables, comme de nombreuses études en font le constat ([Ezashi et al., 2009](#); [Honda et al., 2008](#); [Li et al., 2011b](#); [Nagy et al., 2011](#); [Wu et al., 2009](#)). En revanche, il a été possible d'obtenir des iPSCs présentant les caractéristiques cardinales des cellules pluripotentes chez ces mêmes espèces. Ainsi, on peut dire que la reprogrammation a permis d'obtenir des PSCs chez certaines espèces où la dérivation ne l'avait pas permis.

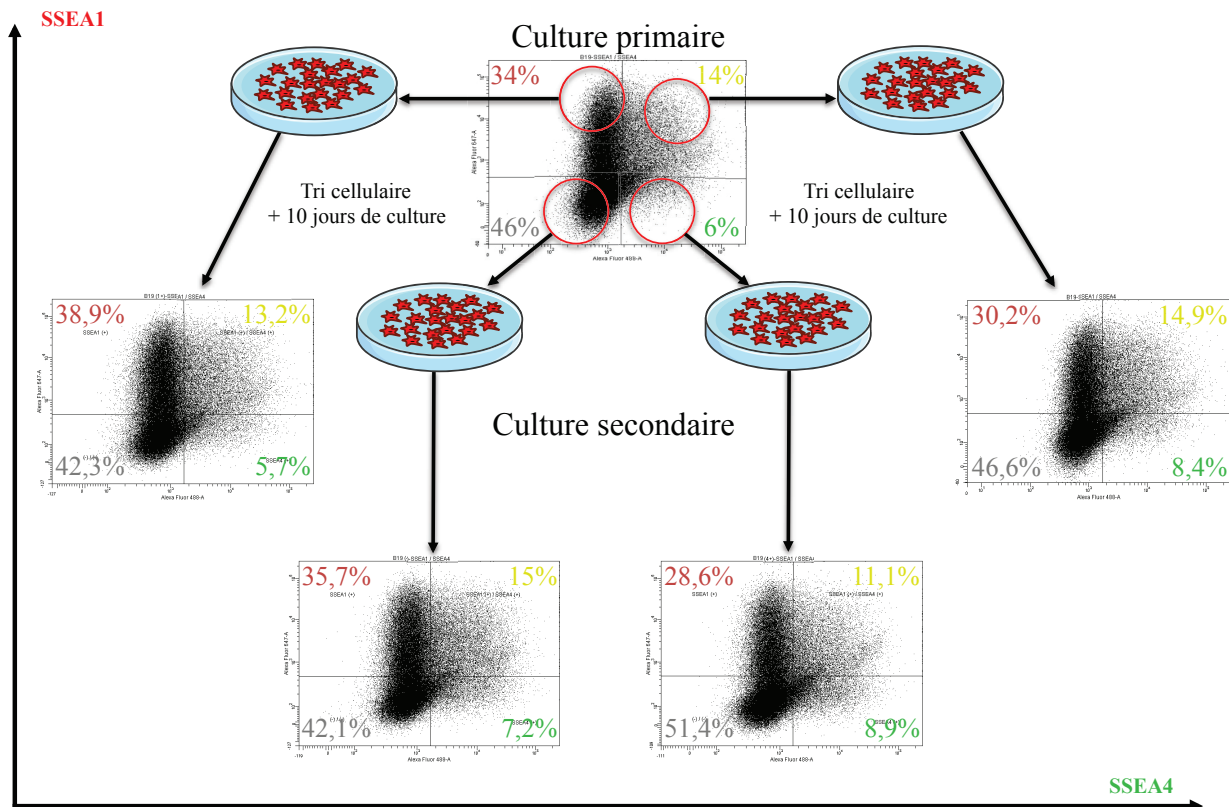
## 1.2.L'état métastable chez le lapin

Chez la souris, la population de PSCs est hétérogène et composée de différentes sous populations identifiées par l'expression différentielle de certains marqueurs (*Rex1*, *Stella*, *Pecam1*, *Zscan4* et *Nanog*) (Chambers et al., 2007; Furusawa et al., 2004; Hayashi et al., 2008; Singh et al., 2007; Toyooka et al., 2008; Zalzman et al., 2010). L'état des mESCs est décrit comme métastable car les cellules fluctuent spontanément entre ces différentes sous populations qui présentent des différences moléculaires et fonctionnelles.

A l'instar de la souris, les PSCs de lapin représentent une population hétérogène de cellules. Nous avons mis en évidence l'existence de sous populations grâce à l'expression différentielle des marqueurs de surface SSEA1 et SSEA4. La co-expression du marqueur SSEA1 spécifique aux PSCs murines, avec le marqueur SSEA4 spécifique des PSCs de primates est également une particularité propre aux iPSCs de lapin.

Outre l'expression de SSEA1 et SSEA4, la caractérisation de ces sous populations a révélé des différences. En effet, le "clustering" hiérarchique issu de l'analyse du transcriptome des différentes sous-populations de RbiPSCs a permis de ségréger les cellules SSEA+ et les cellules SSEA-. De plus, la balance d'expression des cadhérines permet également de distinguer les sous-populations SSEA+ (*Cdh1*<sup>élevé</sup>/*Cdh2*<sup>faible</sup>) et SSEA- (*Cdh1*<sup>faible</sup>/*Cdh2*<sup>élevé</sup>). Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une différence moléculaire entre les différentes sous populations. En réponse à des dommages à l'ADN, les RbiPSCs SSEA1+ possèdent un seul point de contrôle en phase G2, caractéristique des cellules souches pluripotentes. En revanche une partie de la population SSEA1- présente deux points de contrôle en phase G1 et G2, caractéristique de cellules somatiques. Ces résultats suggèrent l'existence de différences fonctionnelles entre les différentes sous populations.

Enfin, après tri au cytomètre en flux, la culture secondaire de chaque sous population durant 10 jours permet d'obtenir à nouveau les 4 sous populations (SSEA1+/4+, 1+/4-, 1-/4+, 1-/4-). La proportion de ces 4 sous populations est propre à chaque lignée et on la retrouve lors de la culture secondaire (Figure 25). Ces résultats démontrent la métastabilité des RbiPSCs qui fluctuent spontanément entre ces différentes sous populations. Cela suggère également que les cellules qui transitent de la population SSEA1+ à SSEA1- sont capables de réactiver le point de contrôle en G1 et réciproquement, indiquant que l'état métastable implique également des changements fonctionnels majeurs.



**Figure 25 : Culture secondaire des RbiPSCs.**

La figure représente l'analyse au cytomètre en flux du co-immunomarquage anti SSEA4 (axes des abscisses) et SSEA1 (axes des ordonnées). Les différentes sous-populations sont triées et cultivées séparément. La proportion des différentes sous-populations est retrouvée dans la culture secondaire après seulement 10 jours.

Chez la souris, les PSCs Rex1- et Stella- présentent un niveau d'expression supérieur des marqueurs de différenciation précoce et sont plus sujettes à la différenciation spontanée (Hayashi et al., 2008; Toyooka et al., 2008). Chez le lapin la population de RbiPSCs SSEA1-/4- présente deux points de contrôle en réponse aux dommages à l'ADN et apparaît comme la plus distante de l'état de l'ICM de lapin, comme nous le montre le graphique de distance euclidienne. De plus, la sélection des cellules exprimant le vecteur EOS par l'ajout de puromycine, permet d'enrichir la population de cellules SSEA1+ au détriment des cellules SSEA1-. Ces résultats suggèrent que la sous population de cellules SSEA1-/4- contient des cellules différenciées. Cependant, le tri de cette sous-population permet d'obtenir les 4 sous populations de départ. Cela suggère qu'au moins une partie de la sous population SSEA1-/4- reste pluripotente bien que proche de l'engagement vers la différenciation.

En conclusion, les RbiPSCs sont hétérogènes et s'autorenouvellent à un état métastable fluctuant spontanément entre les 4 sous populations aux propriétés moléculaires et fonctionnelles différentes. De plus, il ressort que le vecteur EOS est un moyen efficace de sélectionner les cellules pluripotentes au sein de cette culture hétérogène.



## 1.3. A quel niveau de pluripotence sont stabilisées les PSCs de lapin

### 1.3.1. Les RbESCs et RbiPSCs

En comparaison avec les RbESCs, les RbiPSCs surexpriment certains marqueurs de la pluripotence naïve (*Cdh1*, *Essrb*, *Klf4*, *Pecam1*, *Piwil2* et *Dazl*). Cependant, ce niveau d'expression reste plus faible que celui des cellules de l'ICM ( $1/10^{\text{ème}}$  à  $1/100^{\text{ème}}$ ), qui servent ici de référence de l'état naïf chez le lapin (Osteil et al., 2013). De plus, les RbiPSCs n'expriment pas d'autres marqueurs naïfs comme *Rex1*, *Tbx3*, *Gbx2* et *Fgf4*. Ces résultats obtenus au laboratoire par RT-qPCR sont confirmés par l'analyse globale du transcriptome (Schmaltz-Panneau et al., 2014).

En plus des RbPSCs, nous avons analysé le transcriptome de l'ICM de blastocyste précoce à E3,5 ainsi que l'épiblaste d'embryons au stade pré-gastrula E6. La comparaison des transcriptomes montre une ségrégation forte entre les cellules *in vitro* (RbESCs et RbiPSCs) et *in vivo* (ICM et Epi). Cette analyse permet de différencier les RbiPSCs et les RbESCs, cependant aucun des deux types cellulaires n'apparaît plus proche des cellules de l'embryon.

En se basant sur l'analyse de différents groupes fonctionnels de gènes, il ressort que par rapport aux cellules *in vivo*, les cellules *in vitro* :

- (i) sous-expriment de nombreux marqueurs de pluripotence comme *Tet1/2*, *Prdm14*, *Esrrb*, *Tbx3*, *Rex1*, *Rif1*, *Dppa2*, *Kdmac*.
- (ii) surexpriment des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et plus particulièrement dans la transition G1/S (*Cdkn1/p21*)
- (iii) surexpriment des gènes impliqués dans la différenciation (*Wnt5a*, *Lef1*, *Tcf4*) et le développement embryonnaire (*Hox*, *T*, *Ptx2*).

Ces résultats sont cohérents avec l'observation d'une phase G1 des RbPSCs plus longue que chez les cellules amorcées d'autres espèces (hESCs et RhESCs). De plus, la surexpression des gènes impliqués dans la transition G1/S est en adéquation avec le fait qu'une partie de la population de RbPSCs présente un point de contrôle en G1 en réponse aux dommages à l'ADN. On peut préciser que ces gènes sont exprimés à un niveau supérieur dans les RbESCs par rapport aux RbiPSCs. Ceci est cohérent avec la plus forte proportion de RbESCs présentant un point de contrôle en G1.

La surexpression des gènes de développement ainsi que la sous expression de certains gènes de pluripotence sont des arguments permettant d'expliquer l'incapacité des RbPSCs à coloniser efficacement le blastocyste. L'ensemble de cette analyse transcriptomique permet de conclure que les PSCs de lapin apparaissent comme amorcées voire proches de l'engagement vers la différenciation. Malgré tout, cette conclusion n'est pas en contradiction avec les observations faites au laboratoire. Cela suggère que les différences observées en RT-qPCR sur les marqueurs spécifiques discriminant l'état naïf et amorcé restent pertinentes mais sont minimales et diluées dans l'ensemble des données transcriptomiques.

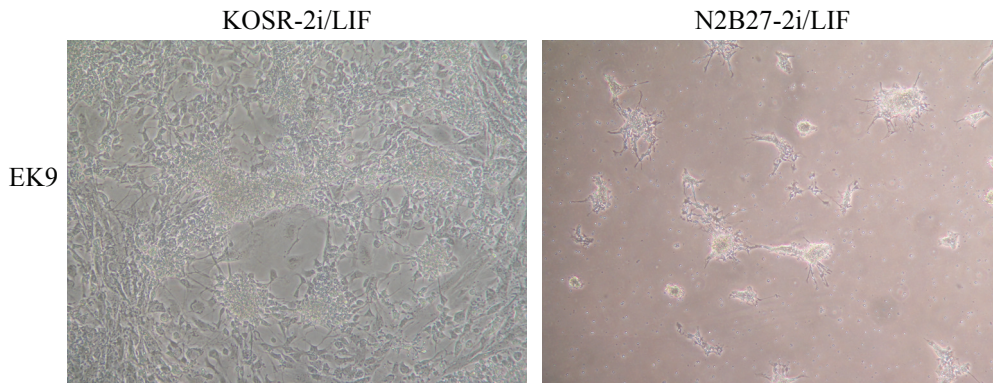
### 1.3.2. Les cellules EK

- Les conditions de culture

Les cellules EK ("enhanced" KLFs) ont été obtenues par la surexpression des gènes *hKLF2* et *hKLF4* dans la lignée RbPSCs B19EOS. Les cellules EKs sont cultivées dans un milieu supplémenté de 10% FBS + LIF (S<sub>10</sub>L). Bien que cultivées en présence de LIF et en absence de FGF, les cellules EK-S<sub>10</sub>L restent dépendantes des voies Activine/FGF. Elles sont cultivées en présence de MEF, connues pour sécréter de l'Activine et du FGF (Bendall et al., 2007; Greber et al., 2007b). L'absence de cellules nourricières conduit à la différenciation des cellules EK-S<sub>10</sub>L, suggérant que la production d'Activine/FGF par les MEF soutient leur autorenouvellement. On peut noter que les RbPSCs B19EOS ne se maintiennent pas plus de 10 passages dans les conditions FBS/LIF et ce, même en présence de cellules nourricières. Cela indique que la concentration de facteurs de croissance requise pour soutenir l'autorenouvellement des cellules EKs doit être inférieure à celle nécessaire aux RbPSCs B19EOS.

Contrairement aux ESCs de souris, les cellules EKs se sont révélées incapables de proliférer de façon stable en présence des 2i. Toutefois des différences notables ont été observées entre lignées. Ainsi les lignées ne surexprimant pas ou peu KLF2 et KLF4 se sont différenciées en moins de 3 passages. Les lignées exprimant fortement les KLFs ont pu proliférer jusqu'à 10 passages en KOSR-2i et 5 passages en conditions N2B27-2i/LIF.

Cette observation conforte l'hypothèse que les lignées exprimant le plus haut niveau de KLFs sont plus proches de l'état naïf. Cependant, au vu de la morphologie des cellules, ces conditions de cultures semblent induire la différenciation des cellules dans la voie neur ectodermique (Figure 26). Ce constat est cohérent avec les observations faites chez le primate, où la condition 2i/LIF semble induire la différenciation des PSCs en neur ectoderme (Fang et al., 2014; Hirano et al., 2012; Li et al., 2011a; Theunissen et al., 2014; Ware et al., 2014).



**Figure 26 : La culture des cellules EKs dans les conditions 2i/LIF**

Photographies représentant la lignée EK9 après 9 passages en condition KORS-2i/LIF et 5 passages dans les conditions N2B27-2i/LIF.

- **Les caractéristiques moléculaires**

La surexpression des gènes *KLF2* et *KLF4* associée à la culture en condition FBS/LIF a permis de réverter les RbiPSCs B19EOS vers l'état naïf de pluripotence. En comparaison au B19EOS, les cellules EK-S<sub>10</sub>L surexpriment de nombreux marqueurs spécifiques de l'état naïf comme *Nanog*, *Esrrb*, *Rex1*, *Piwi2*, *Dazl*, *Tbx3*, *FGF4*, *Cdh1*, *Dppa2* et *Dppa5*. L'expression de certains gènes se rapproche également du niveau d'expression de l'ICM. C'est le cas des marqueurs naïfs *Pecam1* et *Gbx2* dont l'expression diminue ainsi que des marqueurs amorcés *Otx2*, *Pitx2* dont l'expression augmente. Cette observation suggère qu'il peut exister des différences dans les marqueurs discriminant l'état naïf et amorcé entre espèces. Enfin, contrairement aux PSCs KOSR/FGF, le niveau d'expression de la majorité des marqueurs est proche du niveau d'expression de l'ICM (d'un facteur 1 à un facteur 10).

Chez la souris, *Klf4* et *Klf2* activent directement l'expression de *Nanog* et *Esrrb* (Jiang et al., 2008). Dans les cellules EKs, *Nanog* et *Esrrb* sont surexprimés dans les cellules ayant la plus forte expression des transgènes KLF2/KLF4. Ce résultat suggère que certaines cibles des Klf sont conservées entre la souris et le lapin. On peut noter que *Fbxo15* est également une

cible directe des Klf8 chez la souris (Jiang et al., 2008). Cependant son expression ne fluctue pas chez le lapin, suggérant que toutes les cibles ne sont pas conservées entre ces deux espèces.

L'analyse globale du transcriptome montre que les cellules EK-S<sub>10</sub>L forment un cluster différent des RbiPSCs, indiquant un changement majeur de leur transcriptome. De plus, le clustering hiérarchique de corrélation ainsi que l'axe 1 de l'ACI montrent que les cellules EK-S<sub>10</sub>L sont plus proches des cellules de l'embryon que des RbiPSCs avant réversion.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que les cellules EK-S<sub>10</sub>L sont différentes des RbiPSCs et plus proches de l'état des cellules de l'embryon. En adéquation avec ces changements moléculaires, les cellules EKs présentent également des caractéristiques fonctionnelles propres à l'état naïf de pluripotence comme une augmentation du potentiel de colonisation de l'embryon préimplantatoire.

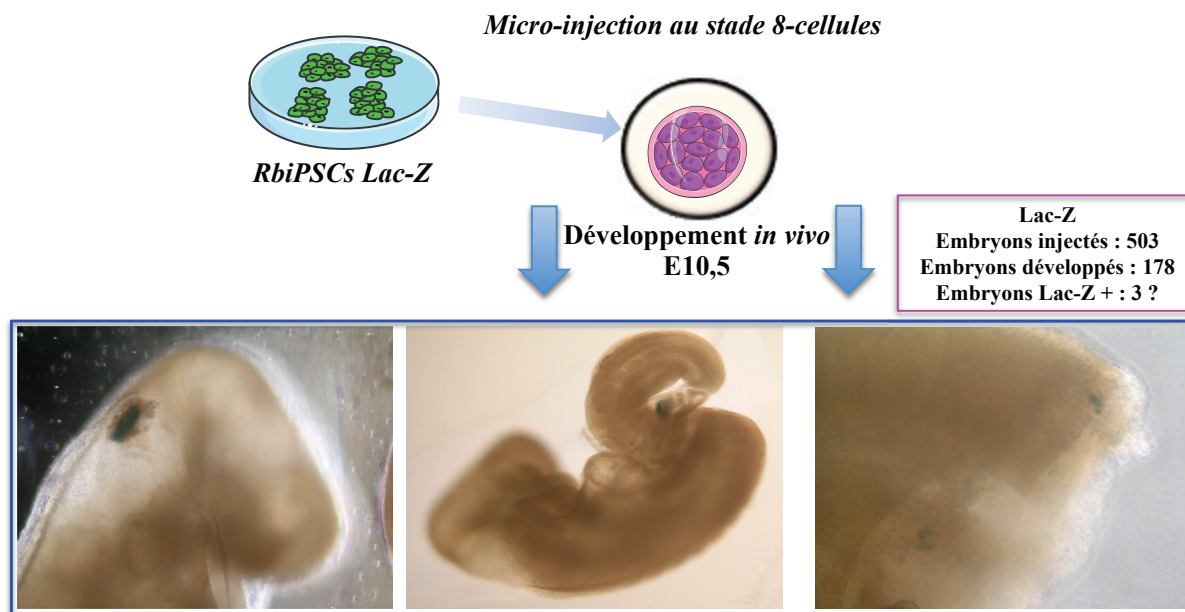
## 1.4. La capacité de colonisation iPSCs de lapin

Afin de tester le niveau de pluripotence des lignées de RbiPSCs obtenues, différentes expériences visant à évaluer le potentiel de colonisation de ces dernières ont été réalisées.

Concernant la lignée B19EOS cultivée en KOSR/FGF2, 10 blastocystes chimériques sur 62 ont été obtenus par agrégation d'un amas de cellules avec une morula. Cependant le principal inconvénient de cette technique est qu'elle requiert la destruction du manteau muqueux et de la zone pellucide de l'embryon. Contrairement à la souris, l'implantation de l'embryon de lapin est impossible sans ces dernières (testé au laboratoire). Cette technique ne permet donc pas le transfert des embryons dans une femelle porteuse, empêchant ainsi l'obtention de lapins chimériques.

L'autre technique employée est la micro-injection de cellules dans des embryons au stade 8-cellules. L'analyse des embryons micro-injectés est réalisée après 2 ou 4 jours de développement *in vitro*, soit à E6,5 et E10,5 après transfert dans une femelle porteuse.

Aucune réelle colonisation n'a été obtenue avec les lignées cultivées en KOSR/FGF2 après 2 jours de développement *in vitro*. Seuls 2 blastocystes sur 112 contenant 1 ou 2 cellules dans l'ICM ont été observés. De plus, aucune chimère n'a été obtenue à E10,5 suite au transfert de 503 embryons (données non publiées) (Figure 27). Ces résultats démontrent que les RbiPSCs en KOSR/FGF n'ont ni la capacité de coloniser efficacement l'embryon, ni celle de participer au développement.



### Figure 27 : La participation au développement des RbiPSCs chez le fœtus de lapin

Les RbiPSCs B19 surexprimant le gène rapporteur Lac-Z ont été injectées dans 503 embryons au stade 8-cellules et directement réimplantées dans des femelles pseudo-gestantes. L'analyse a été faite sur 178 fœtus à E10,5 parmi lesquels, seuls trois présentent une coloration à la  $\beta$ Gal. La position ainsi que la répartition des cellules ne semble pas indiquer de réelle colonisation des RbiPSCs B19.

En revanche, les cellules EK-S<sub>10</sub>L (EK30/EK9) présentent une forte capacité de colonisation de l'embryon au stade blastocyste après 2 et 4 jours de développement *in vitro*. Est-ce que la présence de cellules EK dans l'embryon est la preuve d'une réelle colonisation ?

**- Hypothèse : la colonisation observée est un artéfact expérimental découlant de la seule survie des cellules et non de leur colonisation.**

Plusieurs contre arguments peuvent être avancés à l'encontre de cette hypothèse :

1) En utilisant les lignées dépendantes au FGF2, la présence de RbiPSCs peut être observée au stade blastocyste précoce soit 2 jours après injection. Cependant, aucun embryon positif n'a été obtenu au stade blastocyste tardif soit 4 jours après injection. Cela permet de conclure que les rares cellules détectées à 2 jours sont des faux positifs dans le cas des RbiPSCs. Deux articles récents traitent de la réversion de PSCs chez le lapin ([Honda et al., 2013](#); [Kimiko et al., 2014](#)). Les cellules sont injectées dans des embryons au stade 8-cellules qui sont analysés deux jours plus tard. Des embryons colonisés ont été présentés bien qu'aucune donnée numérique n'ait été fournie dans ces deux articles. Aucune colonisation n'a été observée dans des embryons à un stade plus tardif de développement. Ainsi, l'hypothèse que des faux positifs peuvent être observés après deux jours de développement *in vitro* peut expliquer l'absence de colonisation à un stade plus tardif de développement.

2) Des faux positifs peuvent être observés suite à la micro-injection de cellules directement dans le blastocœle. En effet, les cellules sont déposées à l'intérieur de l'embryon, leur simple survie suffirait à observer des embryons positifs. Ici, les cellules sont injectées au stade 8-cellules, la zone pellucide est retirée au bout de 2 jours et l'analyse se fait 4 jours après injection. L'absence de zone pellucide permet d'observer seulement les cellules ayant réellement colonisé l'embryon durant les deux premiers jours. Les cellules simplement survivantes sont éliminées lors de la dépellucidation de l'embryon.

3) Dans plusieurs blastocystes, nous avons observé un nombre de cellules DsRed<sup>+</sup> supérieur au nombre de cellules micro-injectées, indiquant une prolifération des cellules EKs dans l'embryon.

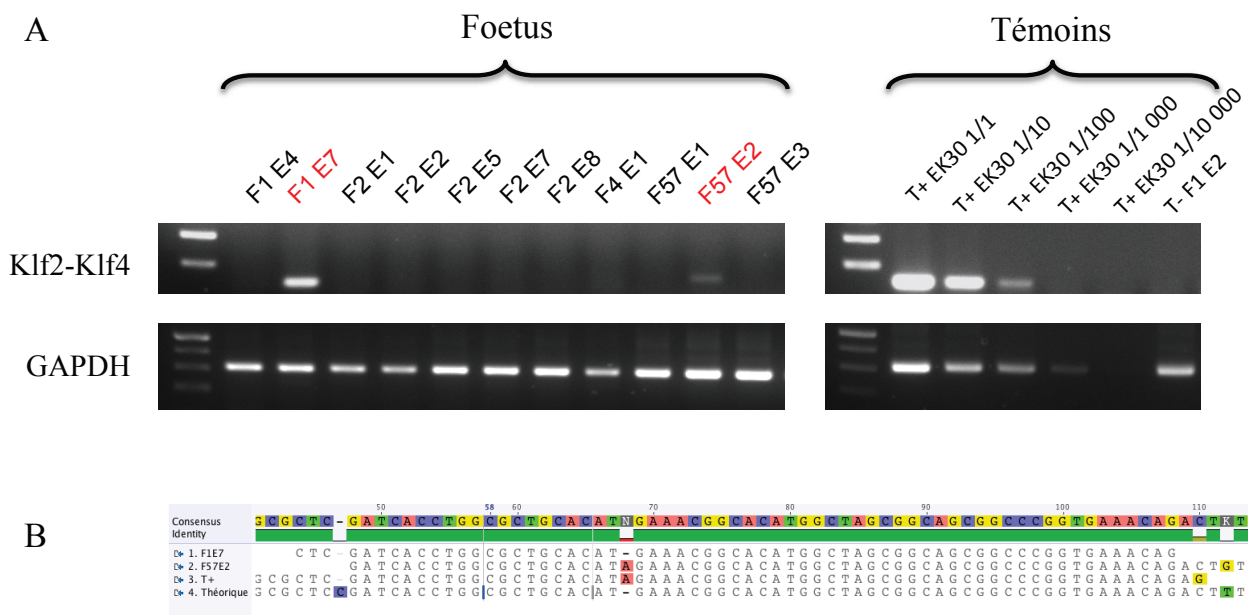
4) Les cellules EKs colonisant l'ICM sont majoritairement GFP<sup>+</sup>, témoin de l'activation du vecteur EOS, suggérant que les cellules sont encore pluripotentes.

5) L'efficacité de colonisation de l'ICM de 12% pour EK30 et 25% pour EK9 a été obtenue lors de 3 expériences différentes et par conséquent est reproductible.



## Si les cellules EKs colonisent réellement l'embryon, ont-elles la capacité de participer au développement ?

Afin de tester la capacité des cellules EK-S<sub>10</sub>L à participer au développement, les embryons ont été transférés dans des femelles pseudo-gestantes directement après micro-injection. Ainsi 1 embryon chimère sur 39 a été obtenu à E6,5 et 2 sur 21 à E10,5. La détection des cellules à E10,5 a été obtenue par PCR sur l'ADN génomique extrait sur le fœtus *in toto* et ne prouve donc pas la participation des cellules EK au développement mais simplement leur présence. On peut préciser ici que, bien que les ESCs de l'équipe d'Arata Honda semblent coloniser efficacement l'embryon préimplantatoire, aucune chimère n'a été détectée à E11,5 par PCR (Kimiko et al., 2014). Le taux de chimérisme estimé pour les deux embryons à E11,5 est inférieur, compris entre 1/10<sup>ème</sup> et 1/100<sup>ème</sup> pour l'un et entre 1/100<sup>ème</sup> 1/1000<sup>ème</sup> pour l'autre (Figure 28). Ce faible taux de chimérisme indique que les cellules sont perdues ou diluées au cours du développement. Ainsi plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer leur incapacité à participer efficacement au développement.

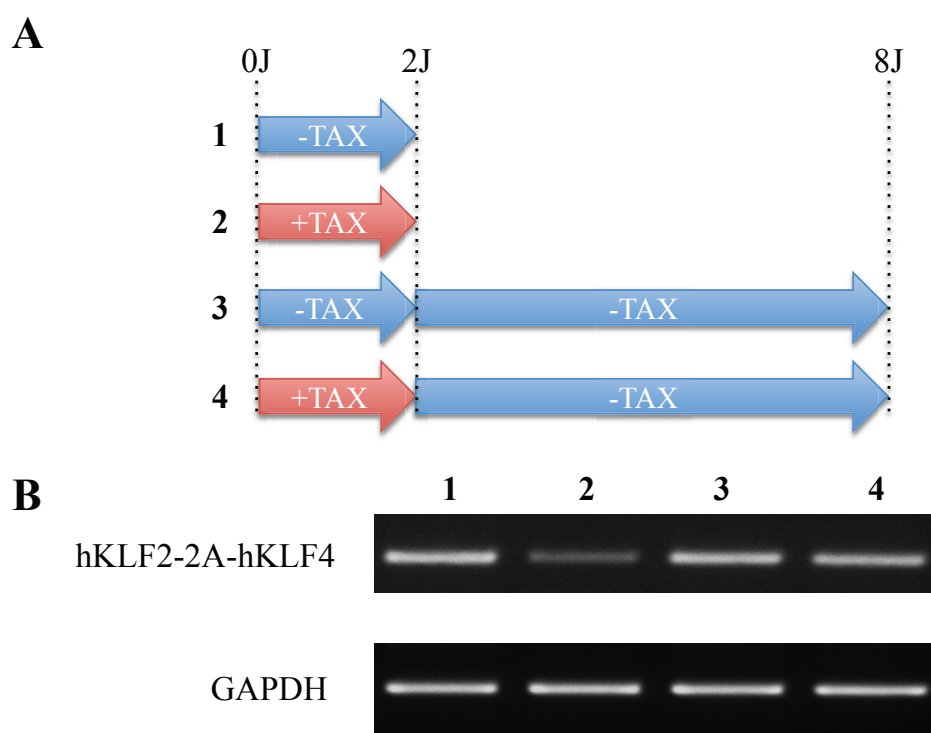


**Figure 28 : La capacité de participation au développement des EKs chez le fœtus de lapin**  
 PCR sur l'ADN génomique issu de fœtus E10,5 *in toto* (A) permettant de détecter les transgènes hKlf2-hKlf4. Les témoins positifs ont été obtenus par dilution en cascade de l'ADNg des EKs. (B) Résultat de séquençage des produits de PCR des fœtus F1 E7, F57 E2 et des cellules EKs montrant 100% d'homologie avec la séquence théorique attendue.



- La surexpression constitutive de KLF2/KLF4 :

Comme le montre l'expérience de différenciation en corps embryoides, la surexpression des *KLFs* n'empêche pas la différenciation des cellules EK dans les trois feuillets embryonnaires, mais induit cependant un retard dans la cinétique de différenciation. Ce retard pourrait expliquer pourquoi les cellules EKs ne participent pas efficacement au développement embryonnaire. Nous avons tenté d'exciser les transgènes *KLFs* par l'action de la CRE recombinase inductible (CRE-ERT2) et vérifier leur élimination par PCR sur l'ADN génomique (Figure 29). Cependant, seule une diminution temporaire a été observée, suivie d'un retour au niveau original après seulement 3 passages (8Jours). Ce résultat suggère que les cellules ayant excisé les transgènes ne se maintiennent pas dans les conditions de culture actuelles et sont remplacées par les cellules ayant conservé les transgènes. Comme cela a été réalisé lors de la réversion des hESCs (Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014), on pourrait essayer de définir des conditions de culture permettant de maintenir les cellules EKs ayant excisé les *KLFs*. Les différentes conditions de culture permettant la réversion des hESCs sont de bons candidats.



**Figure 29 : Excision des transgènes Klf dans les cellules EKs.**

(A) Les cellules surexprimant la CRE-ERT2 sont traitées ou non au Tamoxifène (TAX) pendant deux jours (1-2), puis cultivées 6 jours supplémentaires en absence de TAX (3-4). (B) PCR sur l'ADNg permettant de détecter les transgènes KLF2-KLF4. Les différents puits représentent les différentes conditions schématisées en (A).

- La compétition :

Les cellules EKs pourraient être perdues par compétition avec les cellules de l'embryon se divisant plus rapidement. Plusieurs approches peuvent être envisagées afin de tester cette hypothèse.

La technique de complémentation tétraploïde permet d'obtenir à terme un individu formé intégralement par les cellules micro-injectées (Tam and Rossant, 2003; Tarkowski et al., 1977). Des essais de complémentation tétraploïde ont été envisagés durant mon doctorat, dans le cadre du projet "PLURABBIT" en collaboration avec l'équipe de Zsuzsanna Bosze (Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, Hungary). Cependant, les paramètres de fusion des deux premiers blastomères n'étant pas encore optimisés chez le lapin, aucune expérience n'a pu être réalisée. De plus, la complémentation tétraploïde est à ce jour le test le plus stringent permettant de démontrer la pluripotence naïve. Par conséquent, ce test n'est pas forcément la solution la plus adaptée pour améliorer la participation au développement des cellules EK.

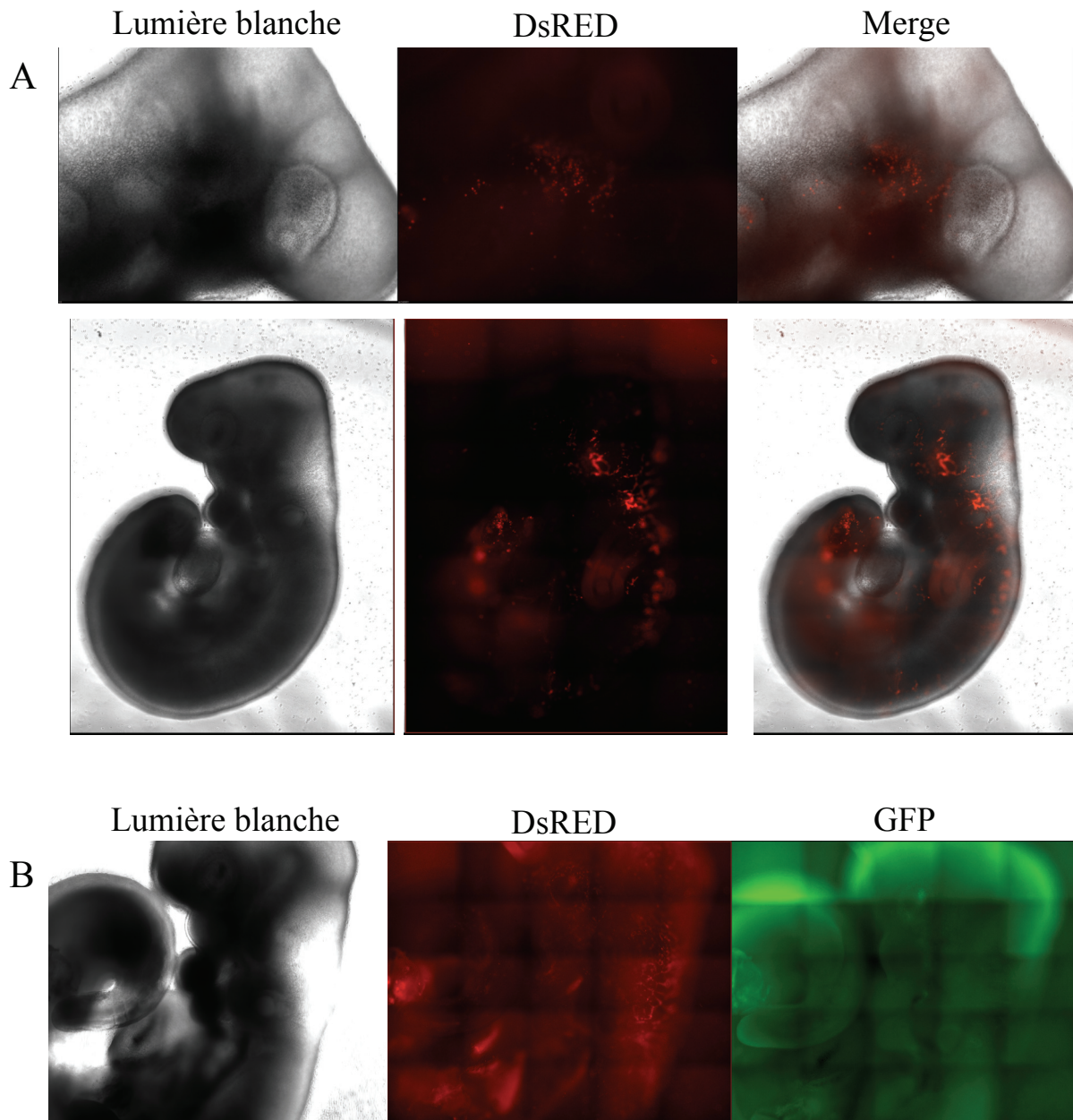
Chez le poulet, la compétition entre les cellules injectées et les cellules hôtes est un problème majeur. En effet, l'injection se fait dans un embryon au stade-X (œuf fraîchement pondu) qui contient alors 40 000 à 80 000 cellules blastodermiques (Eyal-Giladi and Kochav, 1976). Bien qu'il soit possible d'obtenir des chimères par injection de cellules blastodermiques d'un autre embryon à ce stade, le grand nombre de cellules de l'embryon hôte réduit fortement le taux de chimérisme (Petitte et al., 1990). Pour palier ce problème, la même équipe a démontré que l'irradiation de l'œuf avant injection permet d'augmenter le nombre de chimères ainsi que le taux de chimérisme somatique et germinale (Carscience et al., 1993). On peut imaginer irradier l'embryon receveur pour permettre aux cellules EKs de participer plus largement au développement.

Une autre approche consisterait à utiliser des embryons de différentes races de lapin. Pour toutes les expériences réalisées jusqu'alors, nous avons utilisé des embryons de lapin New Zealand en raison de sa forte production d'embryons en réponse aux traitements hormonaux.

Nous avons à disposition des espèces de taille équivalente telles que le fauve de bourgogne, l'argenté de champagne et le gris du bourbonnais. Des différences dans le développement liées au fond génétique pourraient influencer la compétition avec les cellules injectées et permettre d'augmenter la participation de ces dernières. On pourrait également utiliser des races de lapin plus petites comme le petit sablé des Vosges ou encore le brun marron de Lorraine. Ces derniers sont plus petits mais ont une durée de gestation moyenne équivalente (31 jours). On peut supposer que le développement est sensiblement plus lent, ce qui favoriserait la participation des cellules EKs.

- Problèmes de détection :

Afin de suivre la participation au développement des cellules EK, des lignées surexprimant de façon constitutive la Ds-RED ont été générées et micro-injectées. L'observation des fœtus *in toto* à E11,5 a été perturbée par ce qui s'est avéré être l'auto-fluorescence des cellules sanguines dans le rouge spécifiquement (Figure 30). Le faible taux de chimérisme détecté par PCR suggère que la participation au développement est un événement rare. Ainsi, l'absence de détection de rares cellules fluorescentes rouges dans ces conditions ne permet pas d'exclure leur présence. Une solution liée au problème de détection des cellules EKs dans le fœtus pourrait être d'utiliser le gène rapporteur LacZ à la place du gène Gfp. Pour des problèmes de temps, cette stratégie n'a pas été mise en place.



**Figure 30 : L'auto-fluorescence des cellules sanguine chez le fœtus de lapin.**

(A) Exemples de photographies de fœtus de lapin à E10,5 présentant de la fluorescence dans le canal rouge. (B) Photographie de fœtus en lumière blanche, rouge et vert. L'auto-fluorescence des cellules sanguines est retrouvée uniquement dans le canal rouge et non dans le vert (flèches).

On peut conclure que même si les cellules colonisent bien le blastocyste, la participation au développement reste un événement rare. Ce constat soulève la question de savoir si les cellules EK ont réellement atteint l'état naïf de pluripotence ou si elles s'en rapprochent seulement.

## 1.5. Comment définir les états de pluripotence chez le lapin

Les caractéristiques de cellules souches pluripotentes naïves ne sont pas définies chez le lapin. C'est pourquoi nous avons utilisé les critères et les marqueurs définis chez la souris associés à l'étude comparée des cellules de l'ICM et de l'Epi de lapin. L'analyse du transcriptome de l'embryon de lapin montre que de nombreux marqueurs naïfs définis chez la souris sont surexprimés par l'ICM de lapin par rapport à l'Epi (*Klf4*, *Tbx3*, *Esrrb*, *Dppa3* et *Dazl*) (Schmaltz-Panneau et al., 2014). De plus, d'autres marqueurs sont fortement exprimés par l'ICM de lapin comme *Piwil2*, *Cdh1*, *Dppa2* et *Dpp5*. Cependant, certaines nuances peuvent être apportées quant aux marqueurs exprimés par les cellules à l'état naïf (Tableau 7). Ainsi *Klf5* est surexprimé par les cellules de l'ICM de lapin alors qu'il est exprimé à un niveau comparable par les mESCs et le EpiSCs (Guo et al., 2009). Certains marqueurs naïfs murins comme *Gbx2*, *Dax1* et *Rex1* ne semblent pas discriminer l'ICM et l'Epi mais sont fortement exprimés. De plus, *Cldn6* est fortement exprimé par l'ICM ainsi que par les PSCs de lapin alors qu'il est considéré comme un marqueur amorcé chez la souris. Les marqueurs amorcés *Otx2*, *Pitx2* et *Eomes* sont surexprimés par les cellules de l'Epi en comparaison à l'ICM. Cependant, il apparaît que les PSCs de lapin expriment plus faiblement *Otx2* et *Pitx2* que les cellules de l'ICM alors que leur expression augmente après réversion. Ces différences observées avec la souris peuvent être attribuées à des spécificités liées à l'espèce mais nécessitent d'être confirmées afin de permettre de définir les marqueurs naïfs et amorcés chez le lapin.

**Tableau 7 : Les marqueurs discriminant l'état naïf et amorcé chez le lapin et la souris.**

	Naïf	Naïf/Amorcé ?	Amorcé
<b>Souris</b>	<i>Gbx2, Dax1, Rex1</i>		<i>Sox17, Dkk1, Lefty1, Nodal, Otx2, Pitx2 Cldn6</i>
<b>Souris/Lapin</b>	<i>Klf4, Tbx3, Esrrb, Dppa3, Dazl Cdh1, Dppa2</i>		<i>Eomes, Cdh2, Lefty2</i>
<b>Lapin</b>	<i>Klf5 Dpp5,Dppa2</i>	<i>Gbx2, Dax1, Rex1, Cldn6, Otx2, Pitx2,</i>	

On peut noter que, bien que sous exprimant certains marqueurs naïfs, les cellules de l'Epi expriment *Gbx2*, *Dax1* et *Rex1* au même niveau que l'ICM. De plus, de nombreux marqueurs amorcés ne sont pas surexprimés par les cellules de l'Epi comme *Sox17*, *Dkk1*, *Lefty1* et *Nodal*. Une autre explication serait que l'Epi E6 de lapin représenterait un stade plus précoce du développement ne correspondant pas à l'état amorcé que représente l'Epi E5,5 de souris.

Ce constat soulève les questions suivantes : L'ICM de lapin représente t-il l'état naïf chez le lapin ? L'état naïf de souris est-il le but à atteindre chez les autres espèces ?

## 2. Ouvertures

La définition actuelle des états de pluripotence se base essentiellement sur les travaux réalisés chez la souris. Pour définir les caractéristiques des états de pluripotence chez les autres espèces, nous faisons l'analogie avec les PSCs murines. Le corolaire est que l'on cherche à appliquer les mêmes stratégies d'obtention ou de réversion que chez la souris. Les études récentes traitant de la réversion des hESCs en sont le parfait exemple ([Chen et al.; Takashima et al., 2014](#); [Theunissen et al., 2014](#)). On peut voir que le profil d'expression des hESCs se rapproche plus de celui des mESCs que de l'embryon humain. Cela pose les questions suivantes : va-t-on obtenir des cellules à l'état naïf de l'espèce ou va-t-on simplement obtenir des cellules se rapprochant de l'état des mESCs ? La question sous-jacente est de savoir s'il existe un état naïf chez les espèces non murines.

### 2.1. Le cas particulier de la souris

- **La génération de tératocarcinomes et la pluripotence naïve :**

Les premières mESCs ont été obtenues à partir de la lignée de souris 129, connue pour générer un pourcentage élevé de tératocarcinomes spontanés. Chez des souris de la lignée 129, la substitution du chromosome 18 avec la lignée MOLF induit la perte de génération spontanée de tératocarcinomes ([Anderson et al., 2009](#)). De manière corrélée, la lignée de souris 129-chr18<sup>MOLF</sup> a une efficacité de dérivation 6 fois inférieure ([Anderson et al., 2009](#); [Najm et al., 2011](#)). Cependant le fond génétique n'influence pas l'efficacité de dérivation d'EpiSCs. De la même manière, les lignées NOD non permissives à la dérivation des mESCs, conservent la même efficacité de dérivation d'EpiSCs ([Najm et al., 2011](#)). Ce résultat illustre bien que l'obtention de cellules à l'état naïf est dépendante du fond génétique et liée au potentiel de génération spontané de tératomes, ce qui n'est pas le cas pour les cellules amorcées.

- **La dépendance au LIF :**

La souris apparaît ici comme l'exception et non la règle. Dans les conditions standard de culture, le LIF et le BMP4 permettent la propagation des mESCs, alors que les PSCs de la majorité des autres espèces sont dépendantes des voies FGF/TGF $\beta$ . De ce constat émergent plusieurs interrogations : est-ce que la dépendance au LIF est une caractéristique des cellules naïves ou seulement de la souris ? Est-ce que la sensibilité des mESCs au LIF permet leur maintien dans un état qui est propre à l'espèce ?



Une explication potentielle de la sensibilité des mESCs au LIF vient du fait qu'il contrôle l'implantation et la diapause chez la souris. La diapause est le phénomène d'arrêt de la prolifération cellulaire et du métabolisme, bloquant l'embryon au stade blastocyste chez la souris. Ce phénomène intervient notamment lors de la lactation de la femelle gestante, ce qui permet de retarder le développement embryonnaire durant le temps du sevrage de la portée précédente.

Dans des conditions normales, le signal du LIF n'est pas nécessaire au développement précoce de l'embryon (Chen et al., 2000). En effet des embryons LIF<sup>-/-</sup>, LIFR<sup>-/-</sup> ou gp130<sup>-/-</sup> s'implantent et se développent normalement jusqu'à la moitié de la gestation, voire la naissance (Li et al., 1995; Yoshida et al., 1996). En revanche, lors de la diapause, le signal du LIF est essentiel à l'embryon précoce. Un embryon sauvage peut poursuivre un développement normal après plusieurs semaines en diapause. Cependant, après une période de seulement 6 à 12 jours de diapause, les embryons gp130<sup>-/-</sup> ou LIFR<sup>-/-</sup> s'implantent difficilement et ne se développent pas (Nichols et al., 2001). Les auteurs ont observé que l'absence du signal LIF conduisait à la déplétion progressive de l'épiblaste par apoptose. Ces travaux démontrent que l'activation de gp130 est nécessaire au maintien des cellules de l'épiblaste au stade blastocyste, lors de la diapause. On peut noter que le phénotype des mutants gp130<sup>-/-</sup> est plus sévère que celui des mutants LIFR<sup>-/-</sup>, suggérant qu'une autre molécule que le LIF pourrait participer à l'activation de gp130.

Ces travaux font la démonstration que les cellules de l'épiblaste précoce, dont dérivent les mESCs, sont sensibles au LIF. Les autres espèces de mammifères étudiées classiquement en laboratoire (comme le singe, l'homme, le porc, le bœuf et le lapin) ne présentent pas de diapause. Or, les PSCs de ces différentes espèces ne dépendent généralement pas du LIF en culture (Ezashi et al., 2009; Honda et al., 2008; Osteil et al., 2013; Sumer et al., 2011; Thomson, 1998; Thomson et al., 1995)

Ces différents constats permettent de s'interroger : est-ce que l'implication du LIF dans la diapause de souris est la différence évolutionnaire entre ces espèces ayant permis de stabiliser les mESCs à l'état naïf ?

## 2.2. Comment atteindre la pluripotence naïve chez les autres espèces ?

- La pertinence du milieu 2i/LIF chez les autres espèces

Chez la souris, le milieu 2i/LIF permet de stabiliser les cellules à l'état fondamental de pluripotence (Ying et al., 2008) et améliore également l'efficacité de réversion des cellules amorcées (Bao et al., 2009; Greber et al., 2010; Guo et al., 2009; Hall et al., 2009).

L'origine du milieu 2i vient de l'observation de la balance Nanog/FGF4 dans le développement embryonnaire précoce et les mESCs. La voie FGF4/grb2/MEK induit la spécification des cellules de l'ICM en PrE (Chazaud et al., 2006; Feldman et al., 1995; Guo et al., 2010; Kang et al., 2013). De la même façon, le signal FGF favorise l'état d'engagement des mESCs naïves (Kunath et al., 2007; Stavridis et al., 2007). En inhibant la voie FGF, les cellules de l'embryon de souris génèrent préférentiellement de l'épiblaste (Nichols et al., 2009a) et les mESCs peuvent être maintenues à l'état fondamental de pluripotence en absence d'autres facteurs (-LIF/-BMP4) (Ying et al., 2008).

Cependant, il a été montré que l'inhibition du FGF ou des MAPK ne perturbait pas la formation de l'hypoblaste chez l'homme (Van der Jeught et al., 2012; Kuijk et al., 2012; Roode et al., 2012). Cela indique que ce mécanisme de spécification de l'épiblaste/hypoblaste, impliquant le FGF, n'est pas conservé entre la souris et l'homme. En conséquence, on peut se demander si le milieu 2i est vraiment indiqué pour les hESCs.

De plus, la culture des PSCs de primate dans les conditions N2B27 2i/LIF induit une différenciation des cellules en neurectoderme (Fang et al., 2014; Theunissen et al., 2014; Ware et al., 2014), ce qui est cohérent avec de précédentes observations (Hirano et al., 2012; Li et al., 2011a). En revanche, il semble possible de stabiliser les cellules dans le milieu 2i par l'ajout de FGF2 (Fang et al., 2014; Ware et al., 2014).

### 2.2.1. Les voies de signalisation et l'état de pluripotence

Chez la souris, les états de pluripotence naïf et amorcé sont strictement soutenus par les voies LIF et Activine/FGF respectivement. Chez les autres espèces, les cellules s'autorenouvellent majoritairement à l'état amorcé et sont dépendantes de voies Activine/FGF. Cependant aucun consensus n'existe concernant les voies de signalisation soutenant les cellules à l'état naïf.

Chez des espèces non murines, différentes études rapportent que des PSCs ont la capacité à former des chimères bien qu'étant encore dépendantes au FGF et/ou à l'Activine. Ainsi des iPSCs de porc cultivées en condition KOSR/FGF2 montrent une forte capacité de colonisation (West et al., 2010). La présence d'iPSCs a été détectée par PCR dans de nombreux tissus des nouveaux nés, y compris dans les gonades. Une étude plus récente rapporte la réversion d'iPSCs de singe rhésus à l'état naïf (Fang et al., 2014). Ces cellules ont la capacité de former des chimères interspécifiques après injection dans des embryons de souris. Les auteurs montrent ici que la réversion à l'état naïf n'est possible dans le milieu 2i/LIF qu'en présence de FGF. De la même manière des chimères interspécifiques ont été obtenues avec des PSCs humaines (Gafni et al., 2013). Les cellules naïves présentées dans ces deux derniers articles acquièrent la dépendance au LIF mais restent dépendantes aux voies FGF et/ou Activine. Ces différents travaux montrent que des cellules, bien qu'encore dépendantes aux voies soutenant les cellules amorcées, ont la capacité de former des chimères.

Par ailleurs, dans la majorité des études récentes traitant de la réversion des hESCs, les auteurs montrent que les hESCs "naïves" restent dépendantes du FGF et/ou de l'Activine (Chan et al., 2013; Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014; Valamehr et al., 2014; Ware et al., 2014). Ces facteurs de croissance seraient donc nécessaires pour stabiliser les PSCs de primates à l'état naïf. On peut se demander si la dépendance à ces facteurs indique que les cellules n'ont pas atteint l'état naïf de pluripotence mais plutôt un état intermédiaire ou bien si l'état naïf peut être stabilisé par ces voies chez d'autres espèces.

Venant conforter cette dernière hypothèse, des différences de régulation de la pluripotence ont été observées entre les EpiSCs et les hESCs. En coopération avec la voie Activine, la voie FGF permet de soutenir l'expression de Nanog dans les hESCs alors que cela n'a pas été observé dans les EpiSCs (Greber et al., 2010). Cet exemple illustre une autre différence entre l'homme et la souris, ce qui laisse imaginer que d'autres voies de signalisation pourraient stabiliser les cellules à l'état naïf chez les autres espèces.

- **Le rôle du FGF dans la stabilisation de l'état naïf**

Bien que le FGF stabilise les PSCs à l'état amorcé, il semble également important pour le maintien des PSCs de primate à l'état naïf. Le FGF active de nombreuses cascades de signalisations comme les MAPK, Pi3K/Akt, Jak/Stat, PLC $\gamma$  et mTOR (Dailey et al., 2005). Il apparaît que l'inhibition des MAPK stabilise les cellules vers l'état naïf comme le montre l'utilisation du MEKi dans tous les milieux de réversion chez l'homme. De plus, l'inhibition des autres voies des MAPK (JNK et P38) semble également avoir un effet positif sur la réversion (Fang et al., 2014; Gafni et al., 2013; Theunissen et al., 2014).

En revanche, les cellules restent dépendantes du FGF même en présence des inhibiteurs des MAPK. Ceci indique que d'autres cascades, en aval du FGF, soutiennent la pluripotence naïve. Ainsi les voies Pi3K et mTOR seraient impliquées dans le maintien de la pluripotence naïve chez le primate (Chan et al., 2013; Fang et al., 2014; Ware et al., 2014). Les actions antagonistes des différentes cascades de signalisations permettraient d'expliquer le rôle contradictoire du FGF dans la stabilisation des cellules à l'état naïf et amorcé.

## **2.3. Perspectives**

L'état naïf est défini par de nombreuses caractéristiques moléculaires et fonctionnelles. Cependant, la démonstration formelle que les cellules s'auto-renouvellent à l'état naïf de pluripotence passe par la génération de chimères. Or, ce point crucial reste la limitation principale de toute étude portant sur l'état naïf chez l'homme. On peut se poser la question de savoir si les hPSCs ont atteint l'état naïf car les cellules acquièrent des caractéristiques de mESCs comme cela a été démontré dans les études récentes.

Tous ces exemples suggèrent toutefois que des différences fondamentales existent entre les rongeurs et les autres espèces. Chez l'homme nous savons déjà que la voie FGF/MAPK n'est pas impliquée dans la formation de l'hypoblaste. Chez les autres espèces comme le lapin, rien n'est encore clairement défini. Il semble donc important d'étudier le développement embryonnaire afin de mieux définir les conditions de culture permettant d'atteindre l'état naïf de pluripotence chez ces différentes espèces. Différentes approches peuvent être envisagées pour palier ce manque.

On pourrait réaliser une analyse au niveau d'une cellule unique par RNA-Seq ou par Q-PCR des cellules de l'embryon. Ces techniques permettent d'étudier l'hétérogénéité des cellules dans l'embryon, qui est la clé de la compréhension des mécanismes de spécification des différents lignages. En association avec les données transcriptomiques obtenues à partir de l'embryon total de lapin, ces nouveaux résultats pourraient nous permettre d'avoir une vision plus globale des mécanismes impliqués dans le développement embryonnaire précoce et notamment lors de la mise en place de la pluripotence.

En association avec les données moléculaires, l'étude des voies de signalisation contrôlant le développement embryonnaire semble cruciale. Chez le lapin, un grand nombre d'embryons peut être produit relativement facilement. Cela nous permettrait de tester différentes combinaisons d'inhibiteurs pharmacologiques afin de déterminer quelles voies sont responsables de la spécification des cellules. Ces informations nous permettraient de définir les conditions idéales pour capturer l'état naïf chez le lapin.

Une des limitations principales dans l'étude de la pluripotence chez le lapin est l'absence de système rapporteur. Il est aujourd'hui possible de générer efficacement des lignées de lapins transgéniques en utilisant la technique des CRISPS/Cas9 (résultats présentés au congrès RGB-Net (Rabbit Genome Biology-Network) de 2014). On pourrait utiliser ce système dans le but d'insérer des gènes rapporteurs sous contrôle de promoteurs endogènes. Les cibles pourraient être des gènes clefs de la pluripotence (*Nanog*, *Oct4*) ainsi que des marqueurs spécifiques discriminant l'état naïf et amorcé (*Esrrb*, *Tbx3*, *Dppa2*). Des embryons issus de ces lapins transgéniques pourraient être utilisés pour faciliter l'étude du développement embryonnaire présenté ci-dessus. Ces lapins transgéniques nous permettraient également d'obtenir des PSCs possédant le système rapporteur. Ces dernières pourraient être utilisées afin de tester de nombreuses conditions de culture et faciliter leur stabilisation à l'état naïf de pluripotence.

*« La vérité scientifique sera toujours plus belle  
que les créations de notre imagination  
et que les illusions de notre ignorance. »*

Claude Bernard (1813-1878)

# **BIBLIOGRAPHIE**

# ***BIBLIOGRAPHIE***

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26, 1276–1284.
- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., et al. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* 25, 803–816.
- Afanassieff, M., Tapponnier, Y., and Savatier, P. (2014). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in Rabbits. *Methods Mol. Biol.*
- Aksoy, I., Giudice, V., Delahaye, E., Wianny, F., Aubry, M., Mure, M., Chen, J., Jauch, R., Bogu, G.K., Nolden, T., et al. (2014). Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat. Commun.* 5, 3719.
- Amano, T., Hirata, T., Falco, G., Monti, M., Lioudmila, V., Yamamizu, K., Akiyama, T., and Ko, M.S.H. (2013). Zscan4 restores the developmental potency of embryonic stem cells. 1–19.
- Ambrosetti, D.C., Basilico, C., Dailey, L., Ambrosetti, D., Basilico, C., and Dailey, L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites . Synergistic Activation of the Fibroblast Growth Factor 4 En.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* 227, 271–278.
- Anderson, P.D., Nelson, V.R., Tesar, P.J., and Nadeau, J.H. (2009). Genetic factors on mouse chromosome 18 affecting susceptibility to testicular germ cell tumors and permissiveness to embryonic stem cell derivation. *Cancer Res.* 69, 9112–9117.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J. a, et al. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376–388.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321, 699–702.
- Artus, J., Piliszek, A., and Hadjantonakis, A.-K. (2011). The primitive endoderm lineage of the mouse blastocyst: sequential transcription factor activation and regulation of differentiation by Sox17. *Dev. Biol.* 350, 393–404.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. 126–140.
- Ban, H., Nishishita, N., Fusaki, N., Tabata, T., Saeki, K., Shikamura, M., Takada, N., Inoue, M., Hasegawa, M., Kawamata, S., et al. (2011). Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14234–14239.
- Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K., and Surani, M.A. (2009). Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 461, 1292–1295.
- Beattie, G.M., Lopez, A.D., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, M.T., King, C.C., and Hayek, A. (2005). Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 23, 489–495.
- Beddington, R.S. (1983). Histogenetic and neoplastic potential of different regions of the mouse embryonic egg cylinder. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 75, 189–204.



- Beddington, S.P. (1981). An autoradiographic analysis of the potency of embryonic ectoderm in the 8th day postimplantation mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *64*, 87–104.
- Beddington, R.S., and Robertson, E.J. (1989). An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* *105*, 733–737.
- Ben-nun, I.F., Montague, S.C., Houck, M.L., Tran, H.T., Garitaonandia, I., Leonardo, T.R., Wang, Y., Charter, S.J., Laurent, L.C., Ryder, O.A., et al. (2011). Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *8*, 2–6.
- Bendall, S.C., Stewart, M.H., Menendez, P., George, D., Vijayaragavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Yang, J., Bossé, M., et al. (2007). IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* *448*, 1015–1021.
- Berg, D.K., Smith, C.S., Pearton, D.J., Wells, D.N., Broadhurst, R., Donnison, M., and Pfeffer, P.L. (2011). Trophectoderm lineage determination in cattle. *Dev. Cell* *20*, 244–255.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* *125*, 315–326.
- Betschinger, J., Nichols, J., Dietmann, S., Corrin, P.D., Paddison, P.J., and Smith, A. (2013). Exit from pluripotency is gated by intracellular redistribution of the bHLH transcription factor Tfe3. *Cell* *153*, 335–347.
- Blair, K., Leitch, H.G., Mansfield, W., Dumeau, C.-É., Humphreys, P., and Smith, A.G. (2012). Culture parameters for stable expansion, genetic modification and germline transmission of rat pluripotent stem cells. *Biol. Open* *1*, 58–65.
- Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F.D., Baran, N., and Kedinger, C. (1997). Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* *138*, 1207–1217.
- Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A., and Nichols, J. (2014). The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat. Cell Biol.* *16*.
- Bourillot, P.-Y., Aksoy, I., Schreiber, V., Wianny, F., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., and Savatier, P. (2009). Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog. *Stem Cells* *27*, 1760–1771.
- Boyer, L. a, Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* *122*, 947–956.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* *309*, 255–256.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008a). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* *2*, 151–159.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008b). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* *2*, 151–159.
- Brenin, D., Look, J., Bader, M., Hübner, N., Levan, G., and Iannaccone, P. (1997). Rat embryonic stem cells: a progress report. *Transplant. Proc.* *29*, 1761–1765.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *38*, 455–463.
- Brinster, R.L. (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* *140*, 1049–1056.
- Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. a, et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* *448*, 191–195.

- Brook, F.A., and Gardner, R.L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5709–5712.
- Buecker, C., Chen, H.-H., Polo, J.M., Daheron, L., Bu, L., Barakat, T.S., Okwieka, P., Porter, A., Gribnau, J., Hochedlinger, K., et al. (2010). A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 535–546.
- Buehr, M., and Smith, A. (2003). Genesis of embryonic stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *358*, 1397–1402; discussion 1402.
- Buehr, M., Nichols, J., Stenhouse, F., Mountford, P., Greenhalgh, C.J., Kantachuvesiri, S., Brooker, G., Mullins, J., and Smith, A.G. (2003). Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines. *Biol. Reprod.* *68*, 222–229.
- Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.-L., and Smith, A. (2008). Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* *135*, 1287–1298.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* *210*, 30–43.
- Cai, J., Li, W., Su, H., Qin, D., Yang, J., Zhu, F., Xu, J., He, W., Guo, X., Labuda, K., et al. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 11227–11234.
- Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 157–162.
- Carsience, R.S., Clark, M.E., Gibbins, A.M.V., and Etches, R.J. (1993). Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *675*, 669–675.
- Carter, A.M., and Enders, A.C. (2004). Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *2*, 46.
- Cauffman, G., Van de Velde, H., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2005). Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Mol. Hum. Reprod.* *11*, 173–181.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643–655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* *450*, 1230–1234.
- Chan, E.M., Yates, F., Boyer, L.F., Schlaeger, T.M., and Daley, G.Q. (2008). Enhanced plating efficiency of trypsin-adapted human embryonic stem cells is reversible and independent of trisomy 12/17. *Cloning Stem Cells* *10*, 107–118.
- Chan, Y.-S., Göke, J., Ng, J.-H., Lu, X., Gonzales, K.A.U., Tan, C.-P., Tng, W.-Q., Hong, Z.-Z., Lim, Y.-S., and Ng, H.-H. (2013). Induction of a Human Pluripotent State with Distinct Regulatory Circuitry that Resembles Preimplantation Epiblast. *Cell Stem Cell* *13*, 663–675.
- Chang, K.-H., and Li, M. (2013). Clonal Isolation of an Intermediate Pluripotent Stem Cell State. *Stem Cells*.
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., and Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev. Cell* *10*, 615–624.
- Chen, H., Aksoy, I., Gonnot, F., Osteil, P., Aubry, M., Donnadieu, C., Vos, J. De, Sanlaville, D., and Guérin, J. Reinforcing STAT3 activity reprograms human embryonic stem cells to naïve pluripotency.
- Chen, H., Aksoy, I., Gonnot, F., Osteil, P., Aubry, M., Donnadieu, C., Vos, J. De, Sanlaville, D., and Guérin, J. (2014). Reinforcing STAT3 activity reprograms human embryonic stem cells to naïve pluripotency.
- Chen, J.R., Cheng, J.G., Shatzer, T., Sewell, L., Hernandez, L., and Stewart, C.L. (2000). Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* *141*, 4365–4372.

- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., et al. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111–123.
- Chou, Y.-F., Chen, H.-H., Eijpe, M., Yabuuchi, A., Chenoweth, J.G., Tesar, P., Lu, J., McKay, R.D.G., and Geijsen, N. (2008). The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 135, 449–461.
- Chu, L.-F., Surani, M.A., Jaenisch, R., and Zwaka, T.P. (2011). *Blimp1* expression predicts embryonic stem cell development in vitro. *Curr. Biol.* 21, 1759–1765.
- Cockburn, K., and Rossant, J. (2010). Review series Making the blastocyst : lessons from the mouse. 120.
- Dahéron, L., Opitz, S.L., Zaehres, H., Lensch, W.M., Andrews, P.W., Itskovitz-eldor, J., and Daley, Q. (2004). Stem Cells. 770–778.
- Dailey, L., Ambrosetti, D., Mansukhani, A., and Basilico, C. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 233–247.
- Deng, J., Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E.M., Antosiewicz-Bourget, J., Egli, D., Maherali, N., Park, I.-H., Yu, J., et al. (2009). Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat. Biotechnol.* 27, 353–360.
- Denker, H.W., and Gerdes, H.J. (1979). The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. I. Transformation during regular preimplantation development. *Anat. Embryol. (Berl.)* 157, 15–34.
- Diwan, S.B., and Stevens, L.C. (1976). Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 937–942.
- Doetschman, T., Maeda, N., and Smithies, O. (1988a). Targeted mutation of the *Hprt* gene in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8583–8587.
- Doetschman, T., Williams, P., and Maeda, N. (1988b). Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev. Biol.* 127, 224–227.
- Doi, A., Park, I.-H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., et al. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 41, 1350–1353.
- Dravid, G., Ye, Z., Hammond, H., Chen, G., Pyle, A., Donovan, P., Yu, X., and Cheng, L. (2005). Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 1489–1501.
- Duranthon, V., Beaujean, N., Brunner, M., Odening, K.E., Santos, a N., Kacs Kovics, I., Hiripi, L., Weinstein, E.J., and Bosze, Z. (2012). On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Res.* 21, 699–713.
- Van Eijk, M.J., van Rooijen, M.A., Modina, S., Scesi, L., Folkers, G., van Tol, H.T., Bevers, M.M., Fisher, S.R., Lewin, H.A., Rakacolli, D., et al. (1999). Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine *POU5F1*. *Biol. Reprod.* 60, 1093–1103.
- Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells* 26, 2467–2474.
- Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., and Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* 41, 968–976.
- Esteban, M. a, Xu, J., Yang, J., Peng, M., Qin, D., Li, W., Jiang, Z., Chen, J., Deng, K., Zhong, M., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J. Biol. Chem.* 284, 17634–17640.
- Evans, M.J. (1972). The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28, 163–176.

- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Evans, M.J., Bradley, A., Kuehn, M.R., and Robertson, E.J. (1985). The ability of EK cells to form chimeras after selection of clones in G418 and some observations on the integration of retroviral vector proviral DNA into EK cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50, 685–689.
- Eyal-Giladi, H., and Kochav, S. (1976). From Cleavage to Primitive Streak Formation : A Complementary Normal Table and a New Look at the First Stages of the Development of the Chick. 337, 321–337.
- Ezashi, T., Telugu, B.P.V.L., Alexenko, A.P., Sachdev, S., Sinha, S., and Roberts, R.M. (2009). Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10993–10998.
- Falco, G., Lee, S.-L., Stanghellini, I., Bassey, U.C., Hamatani, T., and Ko, M.S.H. (2007). Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 307, 539–550.
- Fändrich, F., Lin, X., Chai, G.X., Schulze, M., Ganten, D., Bader, M., Holle, J., Huang, D.-S., Parwaresch, R., Zavazava, N., et al. (2002). Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat. Med.* 8, 171–178.
- Fang, R., Liu, K., Zhao, Y., Li, H., Zhu, D., Du, Y., Xiang, C., Li, X., Liu, H., Miao, Z., et al. (2014). Generation of Naive Induced Pluripotent Stem Cells from Rhesus Monkey Fibroblasts. *Cell Stem Cell* 15, 488–496.
- Fang, Z.F., Gai, H., Huang, Y.Z., Li, S.G., Chen, X.J., Shi, J.J., Wu, L., Liu, A., Xu, P., and Sheng, H.Z. (2006). Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. *Exp. Cell Res.* 312, 3669–3682.
- Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V.E., DeChiara, T.M., and Goldfarb, M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* 267, 246–249.
- Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.-H., Heng, J.-C.D., Chan, Y.-S., Yaw, L.-P., Zhang, W., Loh, Y.-H., Han, J., et al. (2009). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat. Cell Biol.* 11, 197–203.
- Festuccia, N., Osorno, R., Halbritter, F., Karwacki-Neisius, V., Navarro, P., Colby, D., Wong, F., Yates, A., Tomlinson, S.R., and Chambers, I. (2012). Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 11, 477–490.
- Finch, B.W., and Ephrussi, B. (1967). RETENTION OF MULTIPLE DEVELOPMENTAL POTENTIALITIES BY CELLS OF A MOUSE TESTICULAR TERATOCARCINOMA DURING PROLONGED CULTURE in vitro AND THEIR EXTINCTION UPON HYBRIDIZATION WITH CELLS OF PERMANENT LINES. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 57, 615–621.
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., and Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* 144, 1–10.
- Francis, N.J., Kingston, R.E., and Woodcock, C.L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306, 1574–1577.
- Furusawa, T., Ohkoshi, K., Honda, C., Takahashi, S., and Tokunaga, T. (2004). Embryonic stem cells expressing both platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and stage-specific embryonic antigen-1 differentiate predominantly into epiblast cells in a chimeric embryo. *Biol. Reprod.* 70, 1452–1457.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 85, 348–362.
- Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A.A., Manor, Y.S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., et al. (2013). Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*.
- Gardner, R.L. (1982). Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 68, 175–198.

- Gerami-Naini, B., Dovzhenko, O. V., Durning, M., Wegner, F.H., Thomson, J.A., and Golos, T.G. (2004). Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Endocrinology* 145, 1517–1524.
- Gerbe, F., Cox, B., Rossant, J., and Chazaud, C. (2008). Dynamic expression of Lrp2 pathway members reveals progressive epithelial differentiation of primitive endoderm in mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 313, 594–602.
- Giles, J.R., Yang, X., Mark, W., and Foote, R.H. (1993). Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocysts or morulae. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 130–138.
- Gonzalez, R., Lee, J.W., Snyder, E.Y., and Schultz, P.G. (2011). Dorsomorphin promotes human embryonic stem cell self-renewal. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 50, 3439–3441.
- Graur, D., Duret, L., and Gouy, M. (1996). Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature* 379, 333–335.
- Graves, K.H., and Moreadith, R.W. (1993). Derivation and characterization of putative pluripotent embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 424–433.
- Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007a). Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells* 25, 455–464.
- Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007b). Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells* 25, 455–464.
- Greber, B., Wu, G., Bernemann, C., Joo, J.Y., Han, D.W., Ko, K., Tapia, N., Sabour, D., Sternecker, J., Tesar, P., et al. (2010). Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 215–226.
- Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 249–257.
- Guo, G., and Smith, A. (2010). A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. *Development* 137, 3185–3192.
- Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., and Smith, A. (2009). Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136, 1063–1069.
- Guo, G., Huss, M., Tong, G.Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N.D., and Robson, P. (2010). Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev. Cell* 18, 675–685.
- Gurdon, J.B., and Byrne, J. a (2003). The first half-century of nuclear transplantation. *Biosci. Rep.* 24, 545–557.
- Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., et al. (2009). Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 5, 597–609.
- Hall, L.L., Byron, M., Butler, J., Becker, K.A., Nelson, A., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Stein, J., Stein, G., Ware, C., et al. (2008). X-inactivation reveals epigenetic anomalies in most hESC but identifies sublines that initiate as expected. *J. Cell. Physiol.* 216, 445–452.
- Han, D.W., Tapia, N., Joo, J.Y., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Bernemann, C., Ko, K., Wu, G., Stehling, M., Do, J.T., et al. (2010a). Epiblast stem cell subpopulations represent mouse embryos of distinct pregastrulation stages. *Cell* 143, 617–627.
- Han, D.W., Greber, B., Wu, G., Tapia, N., Araúzo-Bravo, M.J., Ko, K., Bernemann, C., Stehling, M., and Schöler, H.R. (2011). Direct reprogramming of fibroblasts into epiblast stem cells. *Nat. Cell Biol.* 13, 66–71.



- Han, J., Yuan, P., Yang, H., Zhang, J., Soh, B.S., Li, P., Lim, S.L., Cao, S., Tay, J., Orlov, Y.L., et al. (2010b). Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature* **463**, 1096–1100.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., et al. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* **133**, 250–264.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Mitalipova, M., Cheng, A.W., P, J., Staerk, J., Carey, B.W., Lengner, C.J., Foreman, R., Love, J., et al. (2010a). Metastable Pluripotent States in NOD Mouse Derived ES Cells. *Cell* **4**, 513–524.
- Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., and Soldner, F. (2010b). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *PNAS* **107**, 1–6.
- Hayashi, K., Lopes, S.M.C.D.S., Tang, F., and Surani, M.A. (2008). Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* **3**, 391–401.
- Heng, J.-C.D., Feng, B., Han, J., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.-H., Orlov, Y.L., Huss, M., Yang, L., Lufkin, T., et al. (2010). The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* **6**, 167–174.
- Hirano, K., Nagata, S., Yamaguchi, S., Nakagawa, M., Okita, K., Kotera, H., Ainscough, J., and Tada, T. (2012). Human and mouse induced pluripotent stem cells are differentially reprogrammed in response to kinase inhibitors. *Stem Cells Dev.* **21**, 1287–1298.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Cook, E.G., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2008). A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* **3**, 346–353.
- Honda, A., Hirose, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Shimozawa, N., Hatori, M., Shimizu, N., Murata, T., Katayama, K., et al. (2008). Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. *Reprod Biomed Online* **17**, 706–715.
- Honda, A., Hirose, M., and Ogura, A. (2009). Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.* **315**, 2033–2042.
- Honda, A., Hirose, M., Hatori, M., Matoba, S., Miyoshi, H., Inoue, K., and Ogura, A. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J. Biol. Chem.* **285**, 31362–31369.
- Honda, A., Hatori, M., Hirose, M., Honda, C., Izu, H., Inoue, K., Hirasawa, R., Matoba, S., Togayachi, S., Miyoshi, H., et al. (2013). Naïve-like conversion overcomes the limited differentiation capacity of induced pluripotent stem cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 26157–26166.
- Hsieh, Y.-C., Intawicha, P., Lee, K.-H., Chiu, Y.-T., Lo, N.-W., and Ju, J.-C. (2011). LIF and FGF cooperatively support stemness of rabbit embryonic stem cells derived from parthenogenetically activated embryos. *Cell. Reprogram.* **13**, 241–255.
- Hu, S., Wilson, K.D., Ghosh, Z., Han, L., Wang, Y., Lan, F., Ransohoff, K.J., BurrIDGE, P., and Wu, J.C. (2013). MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. *Stem Cells* **31**, 259–268.
- Huang, Y., Osorno, R., Tsakiridis, A., and Wilson, V. (2012). In Vivo Differentiation Potential of Epiblast Stem Cells Revealed by Chimeric Embryo Formation. *Cell Rep.* **1**–8.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D. a (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* **26**, 795–797.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D. a (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1269–1275.
- Iannaccone, P.M., Taborn, G.U., Garton, R.L., Caplice, M.D., and Brenin, D.R. (1994). Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev. Biol.* **163**, 288–292.

- Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., et al. (2009). A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 5, 491–503.
- Intawicha, P., Ou, Y.-W., Lo, N.-W., Zhang, S.-C., Chen, Y.-Z., Lin, T.-A., Su, H.-L., Guu, H.-F., Chen, M.-J., Lee, K.-H., et al. (2009). Characterization of embryonic stem cell lines derived from New Zealand white rabbit embryos. *Cloning Stem Cells* 11, 27–38.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132, 1273–1282.
- Van der Jeught, M., O’Leary, T., Ghimire, S., Lierman, S., Duggal, G., Versieren, K., Deforce, D., Chuva de Sousa Lopes, S., Heindryckx, B., and De Sutter, P. (2012). The Combination of Inhibitors of FGF/MEK/Erk and GSK3 $\beta$  Signaling Increases the Number of OCT3/4- and NANOG-Positive Cells in the Human Inner Cell Mass, But Does Not Improve Stem Cell Derivation. *Stem Cells Dev.* 00.
- Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N.J., Chen, Z.Y., Robbins, R.C., Kay, M. a, et al. (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat. Methods* 7, 197–199.
- Jiang, J., Chan, Y.-S., Loh, Y.-H., Cai, J., Tong, G.-Q., Lim, C.-A., Robson, P., Zhong, S., and Ng, H.-H. (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 353–360.
- Jiang, J., Lv, W., Ye, X., Wang, L., Zhang, M., Yang, H., Okuka, M., Zhou, C., Zhang, X., Liu, L., et al. (2013). Zscan4 promotes genomic stability during reprogramming and dramatically improves the quality of iPS cells as demonstrated by tetraploid complementation. *Cell Res.* 23, 92–106.
- Jouneau, A., Ciaudo, C., Sismeiro, O., Brochard, V., Jouneau, L., Vandormael-Pournin, S., Coppée, J.-Y., Zhou, Q., Heard, E., Antoniewski, C., et al. (2012). Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA* 18, 253–264.
- Kahan, B.W., and Ephrussi, B. (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 44, 1015–1036.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771–775.
- Kang, H.B., Kim, J.S., Kwon, H.-J., Nam, K.H., Youn, H.S., Sok, D.-E., and Lee, Y. (2005). Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line MizhES1. *Stem Cells Dev.* 14, 395–401.
- Kang, M., Piliszek, A., Artus, J., and Hadjantonakis, A.-K. (2013). FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. *Development* 140, 267–279.
- Kelly, K.F., Ng, D.Y., Jayakumaran, G., Wood, G. a, Koide, H., and Doble, B.W. (2011).  $\beta$ -catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism. *Cell Stem Cell* 8, 214–227.
- Kigami, D. (2002). MuERV-L Is One of the Earliest Transcribed Genes in Mouse One-Cell Embryos. *Biol. Reprod.* 68, 651–654.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.
- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araújo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., et al. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646–650.
- Kim, J.B., Sebastiano, V., Wu, G., Araújo-Bravo, M.J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrich, M., van den Boom, D., et al. (2009b). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136, 411–419.
- Kim, J.B., Greber, B., Araújo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Schöler, H.R. (2009c). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649–3.



- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*.
- Kimiko, H., Hirose, M., and Honda, A. (2014). Naïve-like conversion enhances the difference in innate in vitro differentiation capacity between rabbit ES cells and iPS cells.
- Kirchhof, N., Carnwath, J.W., Lemme, E., Anastassiadis, K., Schöler, H., and Niemann, H. (2000). Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol. Reprod.* 63, 1698–1705.
- Kiyonari, H., Kaneko, M., Abe, S., and Aizawa, S. (2010). Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability. *Genesis* 48, 317–327.
- KLEINSMITH, L.J., and PIERCE, G.B. (1964). MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Res.* 24, 1544–1551.
- Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., and Rizzino, A. (2008). Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 903–911.
- Kuijk, E.W., Du Puy, L., Van Tol, H.T. a, Oei, C.H.Y., Haagsman, H.P., Colenbrander, B., and Roelen, B. a J. (2008). Differences in early lineage segregation between mammals. *Dev. Dyn.* 237, 918–927.
- Kuijk, E.W., van Tol, L.T. a, Van de Velde, H., Wubbolts, R., Welling, M., Geijsen, N., and Roelen, B. a J. (2012). The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* 139, 871–882.
- Kunath, T., Saba-El-Leil, M.K., Almousailleakh, M., Wray, J., Meloche, S., and Smith, A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 134, 2895–2902.
- Leahy, A., Xiong, J.W., Kuhnert, F., and Stuhlmann, H. (1999). Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J. Exp. Zool.* 284, 67–81.
- Lee, D.R., Lee, J.E., Yoon, H.S., Roh, S.I., and Kim, M.K. (2001). Compaction in preimplantation mouse embryos is regulated by a cytoplasmic regulatory factor that alters between 1- and 2-cell stages in a concentration-dependent manner. *J. Exp. Zool.* 290, 61–71.
- Lengner, C.J., Gimelbrant, A. a, Erwin, J. a, Cheng, A.W., Guenther, M.G., Welstead, G.G., Alagappan, R., Frampton, G.M., Xu, P., Muffat, J., et al. (2010). Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* 141, 872–883.
- Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., Song, Z., Ding, M., and Deng, H. (2007). MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation*. 75, 299–307.
- Li, M., Sendtner, M., and Smith, A. (1995). Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature* 378, 724–727.
- Li, P., Tong, C., Mehrian-Shai, R., Jia, L., Wu, N., Yan, Y., Maxson, R.E., Schulze, E.N., Song, H., Hsieh, C.-L., et al. (2008). Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135, 1299–1310.
- Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. (2009). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4, 16–19.
- Li, W., Sun, W., Zhang, Y., Wei, W., Ambasadhan, R., Xia, P., Talantova, M., Lin, T., Kim, J., Wang, X., et al. (2011a). Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8299–8304.
- Li, Y., Cang, M., Lee, A.S., Zhang, K., and Liu, D. (2011b). Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors. *PLoS One* 6, e15947.
- Li, Y., Li, X., Zhao, H., Feng, R., Zhang, X., Tai, D., An, G., Wen, J., and Tan, J. (2013). Efficient induction of pluripotent stem cells from menstrual blood. *Stem Cells Dev.* 22, 1147–1158.

- Liao, B., Bao, X., Liu, L., Feng, S., Zovoilis, A., Liu, W., Xue, Y., Cai, J., Guo, X., Qin, B., et al. (2011). MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J. Biol. Chem.* 286, 17359–17364.
- Liao, J., Cui, C., Chen, S., Ren, J., Chen, J., Gao, Y., Li, H., Jia, N., Cheng, L., Xiao, H., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 4, 11–15.
- Lin, S.-L., Chang, D.C., Lin, C.-H., Ying, S.-Y., Leu, D., and Wu, D.T.S. (2011). Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res.* 39, 1054–1065.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68–73.
- Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K., et al. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3, 587–590.
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38, 431–440.
- Loh, Y.-H., Agarwal, S., Park, I.-H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476–5479.
- Louvet, S., Aghion, J., Santa-Maria, A., Mangeat, P., and Maro, B. (1996). Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Biol.* 177, 568–579.
- Lyssiotis, C. a, Foreman, R.K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L.L., Charette, B.D., Bouchez, L.C., et al. (2009). Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8912–8917.
- Ma, H., Morey, R., O'Neil, R.C., He, Y., Daughtry, B., Schultz, M.D., Hariharan, M., Nery, J.R., Castanon, R., Sabatini, K., et al. (2014). Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 511, 177–183.
- Ma, Y.G., Rosfjord, E., Huebert, C., Wilder, P., Tiesman, J., Kelly, D., and Rizzino, A. (1992). Transcriptional regulation of the murine k-FGF gene in embryonic cell lines. *Dev. Biol.* 154, 45–54.
- Macarthur, C.C., Fontes, A., Ravinder, N., Kuninger, D., Kaur, J., Bailey, M., Taliana, A., Vemuri, M.C., and Lieu, P.T. (2012). Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA Sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions. *Stem Cells Int.* 2012, 564612.
- Macfarlan, T.S., Gifford, W.D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H.M., Bonanomi, D., Firth, A., Singer, O., Trono, D., and Pfaff, S.L. (2012). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* 487, 57–63.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55–70.
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., and Hochedlinger, K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 340–345.
- Manes, C. (1973). The participation of the embryonic genome during early cleavage in the rabbit. *Dev. Biol.* 32, 453–459.
- Maraghechi, P., Hiripi, L., Tóth, G., Bontovics, B., Bősze, Z., and Góczy, E. (2013). Discovery of pluripotency-associated microRNAs in rabbit preimplantation embryos and embryonic stem-like cells. *Reproduction* 145, 421–437.
- Marchetto, M.C.N., Yeo, G.W., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2009). Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 4, e7076.

- Marks, H., Kalkan, T., Menafrá, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, A. F., Smith, A., et al. (2012). The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149, 590–604.
- Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R. a, and Jaenisch, R. (2008a). Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 3, 132–135.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., et al. (2008b). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134, 521–533.
- Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., Göttgens, B., Niwa, H., and Smith, A. (2012). Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 11, 491–504.
- Martello, G., Bertone, P., and Smith, A. (2013). Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J.* 32, 2561–2574.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells *Developmental Biology* : 78, 7634–7638.
- Martin, G.R., and Evans, M.J. (1974). The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* 2, 163–172.
- Martin, G.R., and Evans, M.J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1441–1445.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. a, et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 625–635.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., and Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 18, 4261–4269.
- McWhir, J., Schnieke, A.E., Ansell, R., Wallace, H., Colman, A., Scott, A.R., and Kind, A.J. (1996). Selective ablation of differentiated cells permits isolation of embryonic stem cell lines from murine embryos with a non-permissive genetic background. *Nat. Genet.* 14, 223–226.
- Meilhac, S.M., Adams, R.J., Morris, S.A., Danckaert, A., Le Garrec, J.-F., and Zernicka-Goetz, M. (2009). Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 331, 210–221.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49–55.
- Mintz, B., and Illmensee, K. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3585–3589.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631–642.
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., et al. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* 27, 743–745.
- Miyanari, Y., and Torres-Padilla, M.-E. (2012). Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of Nanog. *Nature* 483, 470–473.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D.L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., et al. (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8, 633–638.

- Monk, M. (1981). A stem-line model for cellular and chromosomal differentiation in early mouse-development. *Differentiation*. *19*, 71–76.
- Morris, S. a, Teo, R.T.Y., Li, H., Robson, P., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. (2010). Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 6364–6369.
- Morrissey, E.E., Ip, H.S., Lu, M.M., and Parmacek, M.S. (1996). GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev. Biol.* *177*, 309–322.
- Nagy, K., Sung, H.-K., Zhang, P., Laflamme, S., Vincent, P., Agha-Mohammadi, S., Woltjen, K., Monetti, C., Michael, I.P., Smith, L.C., et al. (2011). Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. *Stem Cell Rev.* *7*, 693–702.
- Najm, F.J., Chenoweth, J.G., Anderson, P.D., Nadeau, J.H., Redline, R.W., McKay, R.D.G., and Tesar, P.J. (2011). Isolation of epiblast stem cells from preimplantation mouse embryos. *Cell Stem Cell* *8*, 318–325.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* *26*, 101–106.
- Nam, Y., Chen, C., Gregory, R.I., Chou, J.J., and Sliz, P. (2011). Molecular basis for interaction of let-7 microRNAs with Lin28. *Cell* *147*, 1080–1091.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, a (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* *95*, 379–391.
- Nichols, J., Chambers, I., Taga, T., and Smith, a (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development* *128*, 2333–2339.
- Nichols, J., Silva, J., Roode, M., and Smith, A. (2009a). Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development* *136*, 3215–3222.
- Nichols, J., Jones, K., Phillips, J.M., Newland, S. a, Roode, M., Mansfield, W., Smith, A., and Cooke, A. (2009b). Validated germline-competent embryonic stem cell lines from nonobese diabetic mice. *Nat. Med.* *15*, 814–818.
- Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A., Ota, M., Nakao, K., and Sasaki, H. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech. Dev.* *125*, 270–283.
- Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., et al. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell* *16*, 398–410.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* *12*, 2048–2060.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, a G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* *24*, 372–376.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* *123*, 917–929.
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009a). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* *460*, 118–122.
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., and Adachi, K. (2009b). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* *460*, 118–122.
- O’Leary, T., Heindryckx, B., Lierman, S., van Bruggen, D., Goeman, J.J., Vandewoestyne, M., Deforce, D., de Sousa Lopes, S.M.C., and De Sutter, P. (2012). Tracking the progression of the human inner cell mass during embryonic stem cell derivation. *Nat. Biotechnol.* *30*, 278–282.
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* *60*, 461–472.

- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949–953.
- Osteil, P., Tapponnier, Y., Markossian, S., Godet, M., Schmaltz-Panneau, B., Jouneau, L., Cabau, C., Joly, T., Blachère, T., Gócza, E., et al. (2013). Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency. *Biol. Open* 2, 613–628.
- Ouhibi, N., Sullivan, N.F., English, J., Colledge, W.H., Evans, M.J., and Clarke, N.J. (1995). Initial culture behaviour of rat blastocysts on selected feeder cell lines. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 311–324.
- Pain, B., Clark, M.E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J., and Etches, R.J. (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122, 2339–2348.
- Paling, N.R.D., Wheadon, H., Bone, H.K., and Welham, M.J. (2004). Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 48063–48070.
- Papaiouannou, V.E., McBurney, M.W., Gardner, R.L., and Evans, M.J. (1975). Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature* 258, 70–73.
- Park, I.-H., Zhao, R., West, J. a, Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. a, Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141–146.
- Pauken, C.M., and Capco, D.G. (2000). The expression and stage-specific localization of protein kinase C isoforms during mouse preimplantation development. *Dev. Biol.* 223, 411–421.
- Peaston, A.E., Evsikov, A. V, Graber, J.H., de Vries, W.N., Holbrook, A.E., Solter, D., and Knowles, B.B. (2004). Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev. Cell* 7, 597–606.
- Perea-Gomez, A., Meilhac, S.M., Piotrowska-Nitsche, K., Gray, D., Collignon, J., and Zernicka-Goetz, M. (2007). Regionalization of the mouse visceral endoderm as the blastocyst transforms into the egg cylinder. *BMC Dev. Biol.* 7, 96.
- Pereira, L., Yi, F., and Merrill, B.J. (2006). Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7479–7491.
- Petitte, J.N., Clark, M.E., Liu, G., Gibbins, A.M.V., and Etches, R.J. (1990). Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *189*, 185–189.
- Piedrahita, J.A., Anderson, G.B., and Bondurant, R.H. (1990). Influence of feeder layer type on the efficiency of isolation of porcine embryo-derived cell lines. *Theriogenology* 34, 865–877.
- Plath, K., Huang, J., Saxe, J.P., Tomilin, A., and Scho, H.R. (2009). Post-Translational Regulation of Oct4 Transcriptional Activity. *4*.
- Plews, J.R., Li, J., Jones, M., Moore, H.D., Mason, C., Andrews, P.W., and Na, J. (2010). Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach. *PLoS One* 5, e14397.
- Plusa, B., Frankenberg, S., Chalmers, A., Hadjantonakis, A.-K., Moore, C.A., Papalopulu, N., Papaiouannou, V.E., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. (2005). Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J. Cell Sci.* 118, 505–515.
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., and Hadjantonakis, A.-K. (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 135, 3081–3091.
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalart, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 848–855.
- Pratt, H.P., Chakraborty, J., and Surani, M.A. (1981). Molecular and morphological differentiation of the mouse blastocyst after manipulations of compaction with cytochalasin D. *Cell* 26, 279–292.



- Ralston, A., and Rossant, J. (2008). Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 313, 614–629.
- Rathjen, P.D., Toth, S., Willis, A., Heath, J.K., and Smith, a G. (1990). Differentiation inhibiting activity is produced in matrix-associated and diffusible forms that are generated by alternate promoter usage. *Cell* 62, 1105–1114.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* 18, 399–404.
- Ribet, D., Louvet-Vallée, S., Harper, F., de Parseval, N., Dewannieux, M., Heidmann, O., Pierron, G., Maro, B., and Heidmann, T. (2008). Murine endogenous retrovirus MuERV-L is the progenitor of the “orphan” epsilon viruslike particles of the early mouse embryo. *J. Virol.* 82, 1622–1625.
- Ringrose, L., Ehret, H., and Paro, R. (2004). Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol. Cell* 16, 641–653.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M. (1986). Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445–448.
- Rodda, D.J., Chew, J.-L., Lim, L.-H., Loh, Y.-H., Wang, B., Ng, H.-H., and Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 280, 24731–24737.
- Rodriguez, A. (2012). Modulation of Pluripotency in the Porcine Embryo and iPS Cells. 7.
- Roode, M., Blair, K., Snell, P., Elder, K., Marchant, S., Smith, A., and Nichols, J. (2012). Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Dev. Biol.* 361, 358–363.
- Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345, 686–692.
- Rossant, J., Chazaud, C., and Yamanaka, Y. (2003). Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358, 1341–1348; discussion 1349.
- Russ, A.P., Wattler, S., Colledge, W.H., Aparicio, S.A., Carlton, M.B., Pearce, J.J., Barton, S.C., Surani, M.A., Ryan, K., Nehls, M.C., et al. (2000). Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 404, 95–99.
- Saito, S., Ugai, H., Sawai, K., Yamamoto, Y., Minamihashi, A., Kurosaka, K., Kobayashi, Y., Murata, T., Obata, Y., and Yokoyama, K. (2002). Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. *FEBS Lett.* 531, 389–396.
- Sakaki-Yumoto, M., Kobayashi, C., Sato, A., Fujimura, S., Matsumoto, Y., Takasato, M., Kodama, T., Aburatani, H., Asashima, M., Yoshida, N., et al. (2006). The murine homolog of SALL4, a causative gene in Okihiro syndrome, is essential for embryonic stem cell proliferation, and cooperates with Sall1 in anorectal, heart, brain and kidney development. *Development* 133, 3005–3013.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bernstein, B.E., Karabetsov, N., Morillon, A., Weise, C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2003). Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol. Cell* 12, 1325–1332.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* 10, 55–63.
- Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhof, D., Kerr, I.M., and Heinrich, P.C. (1998). Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochem. J.* 335 ( Pt 3), 557–565.
- Schmaltz-Panneau, B., Jouneau, L., Osteil, P., Tapponnier, Y., Afanassieff, M., Moroldo, M., Jouneau, A., Daniel, N., Archilla, C., Savatier, P., et al. (2014). Contrasting transcriptome landscapes of rabbit pluripotent stem cells in vitro and in vivo. *Anim. Reprod. Sci.* 149, 67–79.

- Schmitz, J. (2000). SOCS3 Exerts Its Inhibitory Function on Interleukin-6 Signal Transduction through the SHP2 Recruitment Site of gp130. *J. Biol. Chem.* 275, 12848–12856.
- Schöler, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344, 435–439.
- Schöler, H.R., Ciesiolka, T., and Gruss, P. (1991). A nexus between Oct-4 and E1A: implications for gene regulation in embryonic stem cells. *Cell* 66, 291–304.
- Schoonjans, L., Albright, G.M., Li, J.L., Collen, D., and Moreadith, R.W. (1996). Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 439–443.
- Shen, Y., Matsuno, Y., Fouse, S.D., Rao, N., Root, S., Xu, R., Pellegrini, M., Riggs, A.D., and Fan, G. (2008). X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4709–4714.
- Shi, Y., Do, J.T., Despons, C., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008). A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 525–528.
- Shimada, H., Nakada, A., Hashimoto, Y., Shigeno, K., Shionoya, Y., and Nakamura, T. (2010). Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 2.
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008a). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 6, e253.
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., and Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138, 722–737.
- Silva, S.S., Rowntree, R.K., Mekhoubad, S., and Lee, J.T. (2008b). X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4820–4825.
- Sims, R.J., Chen, C.-F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S., and Reinberg, D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J. Biol. Chem.* 280, 41789–41792.
- Singh, A.M., Hamazaki, T., Hankowski, K.E., and Terada, N. (2007). A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 2534–2542.
- Smith, R., and McLaren, A. (1977). Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 41, 79–92.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688–690.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136, 964–977.
- Solter, D., Skreb, N., and Damjanov, I. (1970). Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* 227, 503–504.
- Sommer, C. a, Stadtfeld, M., Murphy, G.J., Hochedlinger, K., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 27, 543–549.
- Stadtfeld, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. (2008a). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr. Biol.* 18, 890–894.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008b). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* (80-. ). 322, 945–949.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008c). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2, 230–240.



- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., and Yancopoulos, G.D. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, 1349–1353.
- Stavridis, M.P., Lunn, J.S., Collins, B.J., and Storey, K.G. (2007). A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development* 134, 2889–2894.
- STEVENS, L.C. (1964). EXPERIMENTAL PRODUCTION OF TESTICULAR TERATOMAS IN MICE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52, 654–661.
- Stevens, L.C. (1967a). The biology of teratomas. *Adv. Morphog.* 6, 1–31.
- Stevens, L.C. (1967b). Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 38, 549–552.
- Stevens, L.C. (1970). Experimental production of testicular teratomas in mice of strains 129, A/He, and their F1 hybrids. *J. Natl. Cancer Inst.* 44, 923–929.
- Stevens, L.C., and Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 40, 1080–1087.
- Strumpf, D., Mao, C.-A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., and Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132, 2093–2102.
- Suemori, H., Tada, T., Torii, R., Hosoi, Y., Kobayashi, K., Imahie, H., Kondo, Y., Iritani, A., and Nakatsuji, N. (2001). Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev. Dyn.* 222, 273–279.
- Sukoyan, M.A., Vatolin, S.Y., Golubitsa, A.N., Zhelezova, A.I., Semenova, L.A., and Serov, O.L. (1993). Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 148–158.
- Sumer, H., Liu, J., Malaver-Ortega, L.F., Lim, M.L., Khodadadi, K., and Verma, P.J. (2011). NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *J. Anim. Sci.* 89, 2708–2716.
- Surani, M.A., and Tischler, J. (2012). News & views research. 8–10.
- Tachibana, M., Sparman, M., Ramsey, C., Ma, H., Lee, H.-S., Penedo, M.C.T., and Mitalipov, S. (2012). Generation of chimeric rhesus monkeys. *Cell* 148, 285–295.
- Tai, C.-I., and Ying, Q.-L. (2013). Gbx2, a LIF/Stat3 target, promotes reprogramming to and retention of the pluripotent ground state. *J. Cell Sci.* 126, 1093–1098.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4109–4117.
- Takashima, Y., Guo, G., Loos, R., Nichols, J., Ficz, G., Krueger, F., Oxley, D., Santos, F., Clarke, J., Mansfield, W., et al. (2014). Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human. *Cell* 158, 1254–1269.
- Tam, P.P. (1984). The histogenetic capacity of tissues in the caudal end of the embryonic axis of the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 82, 253–266.
- Tam, P.P.L., and Rossant, J. (2003). Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *Development* 130, 6155–6163.
- Tang, F., Barbacioru, C., Bao, S., Lee, C., Nordman, E., Wang, X., Lao, K., and Surani, M.A. (2010). Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell Stem Cell* 6, 468–478.

- Tarkowski, B.A.K., Witkowska, A., and Opas, J. (1977). Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid / tetraploid mosaic mouse embryos. *41*, 47–64.
- Telford, N.A., Watson, A.J., and Schultz, G.A. (1990). Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.* *26*, 90–100.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F. a, Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* *448*, 196–199.
- Theunissen, T.W., Powell, B.E., Wang, H., Mitalipova, M., Faddah, D.A., Reddy, J., Fan, Z.P., Maetzel, D., Ganz, K., Shi, L., et al. (2014). Systematic Identification of Defined Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency. *Cell Stem Cell* 1–17.
- Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* *51*, 503–512.
- Thomson, J. a. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (80-. ). *282*, 1145–1147.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 7844–7848.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., and Hearn, J.P. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod.* *55*, 254–259.
- Tomioka, I., Maeda, T., Shimada, H., Kawai, K., Okada, Y., Igarashi, H., Oiwa, R., Iwasaki, T., Aoki, M., Kimura, T., et al. (2010). Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28. *Genes Cells* *15*, 959–969.
- Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K., and Niwa, H. (2008). Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* *135*, 909–918.
- Tsubooka, N., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2009). Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells* *14*, 683–694.
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* *122*, 3502–3510.
- Vackova, I., Ungrova, A., and Lopes, F. (2007). Putative embryonic stem cell lines from pig embryos. *J. Reprod. Dev.* *53*, 1137–1149.
- Valamehr, B., Robinson, M., Abujarour, R., Rezner, B., Vranceanu, F., Le, T., Medcalf, A., Lee, T.T., Fitch, M., Robbins, D., et al. (2014). Platform for Induction and Maintenance of Transgene-free hiPSCs Resembling Ground State Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* *2*, 366–381.
- Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R. a (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* *118*, 4495–4509.
- Vallier, L., Touboul, T., Chng, Z., Brimpari, M., Hannan, N., Millan, E., Smithers, L.E., Trotter, M., Rugg-Gunn, P., Weber, A., et al. (2009). Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. *PLoS One* *4*, e6082.
- Vassena, R., Boué, S., González-Roca, E., Aran, B., Auer, H., Veiga, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* *138*, 3699–3709.
- Vassilieva, S., Guan, K., Pich, U., and Wobus, A.M. (2000). Establishment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *Exp. Cell Res.* *258*, 361–373.
- Vincent, S.D., Dunn, N.R., Sciammas, R., Shapiro-Shalef, M., Davis, M.M., Calame, K., Bikoff, E.K., and Robertson, E.J. (2005). The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development* *132*, 1315–1325.

- Wang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M., et al. (2005). Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *330*, 934–942.
- Wang, S., Tang, X., Niu, Y., Chen, H., Li, B., Li, T., Zhang, X., Hu, Z., Zhou, Q., and Ji, W. (2007). Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. *Stem Cells* *25*, 481–489.
- Wang, S., Shen, Y., Yuan, X., Chen, K., Guo, X., Chen, Y., Niu, Y., Li, J., Xu, R.-H., Yan, X., et al. (2008). Dissecting signaling pathways that govern self-renewal of rabbit embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 35929–35940.
- Wang, W., Yang, J., Liu, H., Lu, D., Chen, X., Zenonos, Z., Campos, L.S., Rad, R., Guo, G., Zhang, S., et al. (2011). Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 18283–18288.
- Ware, C.B., Wang, L., Mecham, B.H., Shen, L., Nelson, A.M., Bar, M., Lamba, D. a, Dauphin, D.S., Buckingham, B., Askari, B., et al. (2009). Histone deacetylase inhibition elicits an evolutionarily conserved self-renewal program in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *4*, 359–369.
- Ware, C.B., Nelson, A.M., Mecham, B., Hesson, J., Zhou, W., Jonlin, E.C., Jimenez-Caliani, A.J., Deng, X., Cavanaugh, C., Cook, S., et al. (2014). Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 4484–4489.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* *7*, 618–630.
- Warren, L., Ni, Y., Wang, J., and Guo, X. (2012). Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA. *Sci. Rep.* *2*, 657.
- Wells, D.N., Misica, P.M., Day, T.A., and Tervit, H.R. (1997). Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. *Biol. Reprod.* *57*, 385–393.
- Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J.E. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* *82*, 241–250.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* *448*, 318–324.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* *2*, 10–12.
- West, F.D., Terlouw, S.L., Kwon, D.J., Mumaw, J.L., Dhara, S.K., Hasneen, K., Dobrinsky, J.R., Stice, S.L., and Al, W.E.T. (2010). Porcine Induced Pluripotent Stem Cells. *19*.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* *336*, 684–687.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* *385*, 810–813.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* *458*, 766–770.
- Wray, J., Kalkan, T., and Smith, A.G. (2010). The ground state of pluripotency. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1027–1032.
- Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., and Smith, A. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 838–845.

- Wu, Z., Chen, J., Ren, J., Bao, L., Liao, J., Cui, C., Rao, L., Li, H., Gu, Y., Dai, H., et al. (2009). Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J. Mol. Cell Biol.* *1*, 46–54.
- Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 971–974.
- Xu, C., Rosler, E., Jiang, J., Lebkowski, J.S., Gold, J.D., O'Sullivan, C., Delavan-Boorsma, K., Mok, M., Bronstein, A., and Carpenter, M.K. (2005). Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* *23*, 315–323.
- Xu, R.-H., Chen, X., Li, D.S., Li, R., Addicks, G.C., Glennon, C., Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.* *20*, 1261–1264.
- Xue, Y., Cai, X., Wang, L., Liao, B., Zhang, H., Shan, Y., Chen, Q., Zhou, T., Li, X., Hou, J., et al. (2013). Generating a non-integrating human induced pluripotent stem cell bank from urine-derived cells. *PLoS One* *8*, e70573.
- Yagi, R., Kohn, M.J., Karavanova, I., Kaneko, K.J., Vullhorst, D., DePamphilis, M.L., and Buonanno, A. (2007). Transcription factor TEAD4 specifies the trophectoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* *134*, 3827–3836.
- Yamanaka, Y., Lanner, F., and Rossant, J. (2010). FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* *137*, 715–724.
- Yan, L., Yang, M., Guo, H., Yang, L., Wu, J., Li, R., Liu, P., Lian, Y., Zheng, X., Yan, J., et al. (2013). Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 1131–1139.
- Yang, J., Chai, L., Fowles, T.C., Alipio, Z., Xu, D., Fink, L.M., Ward, D.C., and Ma, Y. (2008). Genome-wide analysis reveals *Sall4* to be a major regulator of pluripotency in murine-embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19756–19761.
- Yang, J., Gao, C., Chai, L., and Ma, Y. (2010a). A novel *SALL4*/*OCT4* transcriptional feedback network for pluripotency of embryonic stem cells. *PLoS One* *5*, e10766.
- Yang, J., van Oosten, A.L., Theunissen, T.W., Guo, G., Silva, J.C.R., and Smith, A. (2010b). Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. *Cell Stem Cell* *7*, 319–328.
- Yeom, Y.I., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hübner, K., and Schöler, H.R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* *122*, 881–894.
- Yi, F., Pereira, L., Hoffman, J. a, Shy, B.R., Yuen, C.M., Liu, D.R., and Merrill, B.J. (2011). Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* *13*, 762–770.
- Ying, Q.-L., and Smith, A.G. (2003). Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol.* *365*, 327–341.
- Ying, Q.-L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003a). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* *21*, 183–186.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* *453*, 519–523.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003b). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* *115*, 281–292.
- Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., et al. (1996). Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 407–411.
- Yu, J., Vodyanik, M. a, Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. a, Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917–1920.

- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797–801.
- Yu, X., Jin, G., Yin, X., Cho, S., Jeon, J., Lee, S., and Kong, I. (2008). Isolation and characterization of embryonic stem-like cells derived from in vivo-produced cat blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1426–1432.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9, 2635–2645.
- Yuri, S., Fujimura, S., Nimura, K., Takeda, N., Toyooka, Y., Fujimura, Y.-I., Aburatani, H., Ura, K., Koseki, H., Niwa, H., et al. (2009). Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency, of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression. *Stem Cells* 27, 796–805.
- Zakhartchenko, V., Flisikowska, T., Li, S., Richter, T., Wieland, H., Durkovic, M., Rottmann, O., Kessler, B., Gungor, T., Brem, G., et al. (2011). Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals. *Biol. Reprod.* 84, 229–237.
- Zalzman, M., Falco, G., Sharova, L. V., Nishiyama, A., Thomas, M., Lee, S.-L., Stagg, C. a, Hoang, H.G., Yang, H.-T., Indig, F.E., et al. (2010). Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells. *Nature* 464, 858–863.
- Zhan, M., Miura, T., Xu, X., and Rao, M.S. (2005). Conservation and variation of gene regulation in embryonic stem cells assessed by comparative genomics. *Cell Biochem. Biophys.* 43, 379–405.
- Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J.E. (1994). Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264, 95–98.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.
- Zhou, T., Benda, C., Duzinger, S., Huang, Y., Li, X., Li, Y., Guo, X., Cao, G., Chen, S., Hao, L., et al. (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 1221–1228.
- Ziomek, C. (1980). Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell* 21, 935–942.
- Zwaka, T.P., and Thomson, J. a (2005). A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* 132, 227–233.



# ANNEXES





## *ANNEXES*

### **Annexe n°1 : Generation of rabbit pluripotent stem cell lines**

(Publié dans *Theriogénology* en novembre 2012 pages 1774-1786)

**Annexe n°2 : A Short G1 phase is an  
intrinsic determinant of naïve  
embryonic stem cell pluripotency**

(Publié dans *Stem Cell Research* en janvier 2013 pages 118-131)

わたしはわたしのははうえと あぬりすに このはくしろんぶんを ささげる !!!!